

Calciumphosphat-Nanopartikel für die Transfektion zur Synthese biologisch aktiver Proteine und zur Gen-Stummschaltung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Svitlana Chernousova

geboren in Kharkiv / Ukraine

Institut für Anorganische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2009 bis Februar 2015 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Gutachter:	Prof. Dr. M. Epple
	Prof. Dr. B. Siebers
Vorsitzender:	Prof. Dr. T. Schrader

Tag der Disputation: 13.08.2015

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Theoretische Grundlagen	8
2.1	Nukleinsäuren.....	8
2.2	Biokompatibilität und Bioaktivität.....	10
2.3	Transfektion	14
2.4	Gen-Stummschaltung.....	16
2.5	Gentransfersysteme	17
2.6	Calciumphosphat-Nanopartikel für den Nukleinsäuren-Transport	22
2.7	Dispersionskolloide.....	26
3	Materialien und Methoden	30
3.1	Physikalisch-chemische Methoden	30
3.1.1	Elektronenmikroskopie	30
3.1.2	Atomabsorptionsspektroskopie.....	30
3.1.3	Dynamische Lichtstreuung	31
3.1.4	Zetapotential.....	31
3.1.5	UV/Vis-Spektroskopie	32
3.1.6	<i>Nanoparticle tracking analysis</i> (NTA)	32
3.2	Darstellung von Calciumphosphat-Nanopartikeln und Nanostäbchen.....	33
3.2.1	Darstellung von Calciumphosphat/pcDNA3.1(+)- <i>Firefly</i> -Luciferase-Nanopartikeln	33
3.2.2	Darstellung von Calciumphosphat/pcDNA3-eGFP (siRNA)-Nanopartikeln	35
3.2.3	Synthese von Calciumphosphat/pcDNA3-eGFP (siRNA)-Nanostäbchen	36
3.2.4	Darstellung von Calciumphosphat/PEI/pcDNA3-eGFP (siRNA)-Nanostäbchen	37

3.2.5 Darstellung von Calciumphosphat/PEI/pcDNA3-eGFP (siRNA)/PEI-Nanostäbchen.....	37
3.2.6 Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel und Calciumphosphat- Nanostäbchen für die Transfektion der BMP-7- und der VEGF-A- kodierender DNA.....	38
3.2.7 Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit der hBD-3- kodierender DNA funktionalisiert wurden	39
3.3 Bestimmung der Konzentrationen von Nanopartikeln und Nanostäbchen.....	40
3.4 Berechnungen von DNA-, siRNA- und PEI-Konzentrationen	42
3.5 Biologische Experimente	43
3.5.1 Eukaryotische Zellen.....	43
3.5.2 Bakterien	45
3.5.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	46
3.5.4 Transfektion von Zellen	48
3.5.5 Luciferase-Aktivität	50
3.5.6 ELISA	51
3.5.7 Gen-Stummschaltungs-Experimente	51
3.5.8 Zellvitalitätstest.....	53
4 Ergebnisse und Diskussion	54
4.1 Nukleinsäure-funktionalisierte und Polyethylenimin-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel für Transfektion.....	54
4.1.1 Einführung in die Thematik	54
4.1.2 Charakterisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel	56
4.1.3 Zellaufnahme, Transfektionseffizienz und Zytotoxizitätstests.....	60
4.1.4 Kotransfektion von zwei Plasmiden	68
4.1.5 Zusammenfassung.....	71
4.2 <i>In-situ</i> -Untersuchungen der Transfektion mit Calciumphosphat- Nanopartikeln durch <i>time-lapse</i> Mikroskopie	72
4.2.1 Einführung in die Thematik	72

4.2.2 Charakterisierung der aufgereinigten Calciumphosphat/DNA (siRNA)/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel.....	73
4.2.3 <i>In-situ</i> -Untersuchungen der Transfektion.....	77
4.2.4 <i>In-situ</i> -Untersuchungen der Gen-Stummschaltung mit Calciumphosphat/siRNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikeln.....	84
4.2.5 Zusammenfassung.....	89
4.3 Transfektion und Gen-Stummschaltung mit Calciumphosphat-Nanostäbchen.....	90
4.3.1 Einführung in die Thematik.....	90
4.3.2 Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanostäbchen ...	92
4.3.2.1 Charakterisierung.....	92
4.3.2.2 Transfektion, Gen-Stummschaltung und Zellvitalität	94
4.3.3 Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen	104
4.3.3.1 pcDNA3-eGFP-funktionalisierte Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen	105
4.3.3.2 Anti-eGFP-siRNA-funktionalisierte Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen	112
4.3.4 Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen, die mit einer äußeren Polyethylenimin-Schicht umgeladen wurden.....	117
4.3.5 Zusammenfassung.....	122
4.4 <i>In-vitro</i> -Untersuchungen der Calciumphosphat-Nanopartikel und Calciumphosphat-Nanostäbchen als Trägersystem für Nukleinsäuren in einer biologisch aktiven Knochenersatzpaste.....	123
4.4.1 Einführung in die Thematik.....	123
4.4.2 Synthese und Charakterisierung.....	125
4.4.3 Transfektion von Zellen	129
4.4.4 Zellvitalität	133
4.4.5 Kotransfektion von BMP- und VEGF-kodierenden Plasmiden	136

4.4.6 Zusammenfassung	140
4.5 Calciumphosphat-Nanopartikel als Trägersystem für Defensin-kodierende DNA.....	141
4.5.1 Einführung in die Thematik.....	141
4.5.2 Synthese und Charakterisierung.....	142
4.5.3 Transfektion und Zellvitalitätstest	144
4.5.4 Zusammenfassung.....	152
5 Zusammenfassung.....	153
6 Summary	155
7 Literaturverzeichnis.....	157
8 Anhang	176
8.1 Verwendete Materialien	176
8.2 Abkürzungsverzeichnis	181
8.3 Publikationsliste	183
8.4 Lebenslauf	190
Eidesstattliche Erklärung.....	191
Danksagung	192

1 Einleitung

Die Nanotechnologie stellt heutzutage eines der sich am schnellsten entwickelten und meist diskutierten Gebiete der Wissenschaft dar. Nanopartikel sind typische Objekte der Nanotechnologie. Die charakteristische Größe (in mindestens einer Dimension <100 nm), die große spezifische Oberfläche, die Fähigkeit zum Transport und zum Schutz von Molekülen vor Degradation sowie die kontrollierbare Freisetzung der transportierten Moleküle und die spezifische Wechselwirkung mit biologischen Strukturen begründen das Interesse zur Verwendung von Nanopartikeln in der Medizin.

Die Nanopartikel können mit unterschiedlichen biologischen Molekülen (z.B. Nukleinsäuren, Proteinen) funktionalisiert werden und demzufolge verschiedene Funktionen besitzen.^[1-3]

Die für den biomedizinischen Einsatz geeigneten Nanopartikel müssen spezifische Voraussetzungen erfüllen. Neben einer hohen Transfektionseffizienz (hinsichtlich der Verwendung für die Gen-Therapie) dürfen die Nanopartikel nicht toxisch sein und müssen eine gute Biokompatibilität und möglichst eine biologische Abbaubarkeit aufweisen. Die Calciumphosphat-Nanopartikel besitzen eine gute Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den natürlich vorkommenden Calciumphosphaten, die einen wesentlichen Bestandteil von Zähnen und Knochen darstellen. Eine relativ einfache Herstellung und die Möglichkeit zur Funktionalisierung der Partikel mit biologisch aktiven Molekülen (Nukleinsäuren) sind Gründe für die Verwendung von Calciumphosphat-Nanopartikel als Nukleinsäure-Träger in der Gen-Therapie.^[4-5]

In dieser Arbeit werden die Synthese und die Charakterisierung (Abb. 1.1 A) der Calciumphosphat-Nanopartikel und -Nanostäbchen dargestellt. Die Aufnahme durch Zellen (Abb. 1.1 B) und die Effizienz der Calciumphosphat-Nanopartikel

und -Nanostäbchen als Nukleinsäure-Träger für die Transfektion (Abb. 1.1 C) und die Gen-Stummschaltung von eukaryotischen Zellen werden *in vitro* untersucht.

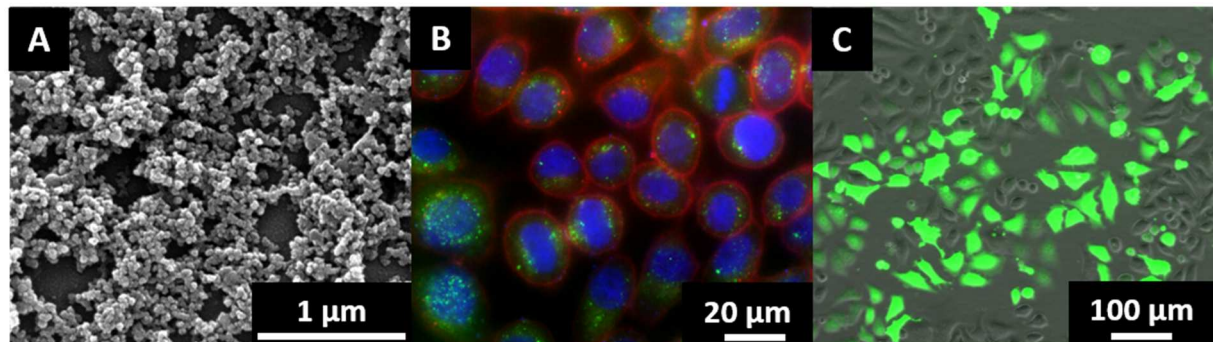


Abb. 1.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln (A), fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HeLa-Zellen mit aufgenommenen Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln (grün) (B), sowie die Überlagerung von licht- und fluoreszenzmikroskopischen Bildern von eGFP-positiven HeLa-Zellen (grün) nach der Transfektion mit Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln (C).

Die Effizienz der Transfektion *in vitro* kann von der Ladung des nanopartikulären Transfektionssystems abhängig sein.^[6-10] In dieser Arbeit wird der Einfluss der Oberflächenladung von Calciumphosphat-Nanopartikeln und -Nanostäbchen auf die Transfektionseffizienz und auf die Gen-Stummschaltungseffizienz untersucht und diskutiert.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Calciumphosphat-Nanopartikel und -Nanostäbchen werden entweder mit Modellprotein-kodierenden Plasmiden funktionalisiert oder mit Plasmiden beladen, die Proteine mit osteogenen (BMP-7) bzw. vaskularisierenden (VEGF-A) Eigenschaften oder ein Peptid mit antimikrobiellen Eigenschaften (hBD-3) kodieren. Die Materialien, die mit wachstumsfaktorenkodierenden Plasmiden funktionalisiert sind, stellen in der Therapie von Knochendefekten eine Alternative zur Anwendung von Wachstumsfaktoren in Form von Proteinen dar.^[11-19] Obwohl die Effizienz von diesen Wachstumsfaktoren bereits nachgewiesen wurde, kann der schnelle Abbau und die Verteilung der Proteine im umgebenden Gewebe nicht überwunden

werden.^[20-31] Hingegen kann die Transfektion von Zellen im Implantatsbereich eine relativ lange und lokale Proteinexpression ermöglichen.^[17, 19] Diese Tatsache sowie eine gute Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit der Calciumphosphate weisen Calciumphosphat-Nanopartikel als vielversprechende Kandidaten für den Einsatz als bioaktive Komponenten in Knochenersatzmaterialien aus. In der vorliegenden Arbeit werden *in-vitro*-Transfektionsuntersuchungen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln, die mit BMP-7 und VEGF-A-kodierender DNA funktionalisiert sind, durchgeführt. Aufgrund dieser Arbeiten wird die Möglichkeit zur Verwendung der Nanopartikel als aktiver Bestandteil von auf Nanopartikeln-basierenden Knochenersatzmaterialien (nanopartikuläre Knochenersatzpaste) diskutiert.

Darüber hinaus werden *in-situ*-Beobachtungen von transfizierten Zellen mit Hilfe der *time-lapse* Mikroskopie durchgeführt. Einige Schlussfolgerungen zum Verständnis der Prozesse, welche die exogenen Nukleinsäuren während der Transfektion in der Zelle begleiten, werden formuliert.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind Polymere, die aus Nukleotiden (Desoxyribonukleotide und Ribonukleotide) bestehen. Jedes Nukleotid besteht aus einer Pentose (Ribose oder Desoxyribose), einer Phosphatgruppe am 5'-Kohlenstoffatom des Zuckers und aus einer stickstoffhaltigen Base (Pyrimidine und Purine). Zu Pyrimidinen zählen Cytosin, Thymin und Uracil, wobei Thymin in der DNA und Uracil in der RNA verwendet werden. Adenin und Guanin zählen zu den Purinen. (Abbildung 2.1).^[32]

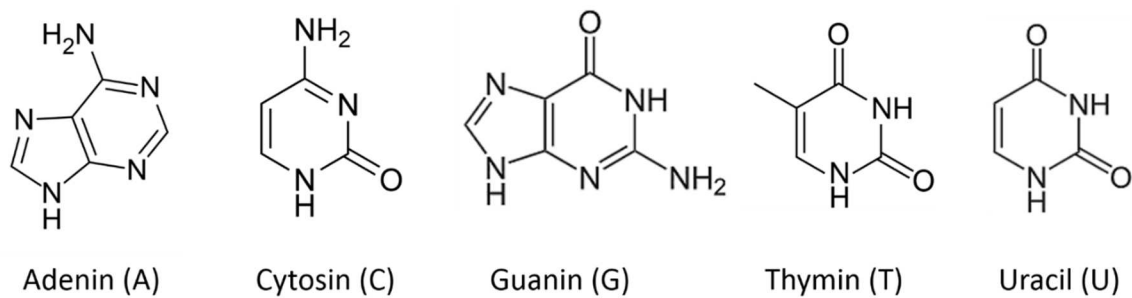


Abb. 2.1: Chemische Struktur der fünf Basen, die in Desoxyribonukleotiden und Ribonukleotiden vorkommen.

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) stellt das genetische Material aller zellulären Lebensformen und einiger Viren dar. Chemisch ist die DNA ein lineares, unverzweigtes Polymer, welches aus vier unterschiedlichen Monomer-Einheiten besteht. Die schematische Doppelhelix-Struktur der DNA ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Für den Gentransfer wird Plasmid-DNA (ein kleines ringförmiges DNA-Molekül, das in *E. coli* vermehrt werden kann) benutzt. Ein oder mehrere fremde Gene werden in das Plasmid eingebaut, um diese Gene mittels eines Gentransfer-Systems in andere eukaryotische Zellen zu transportieren und so die Protein-Produktion in der Ziel-Zelle zu erzeugen.

Die Ribonukleinsäure (RNA) stellt ein Polymer dar, das ähnlich der DNA aufgebaut ist, aber die Ribose als Zucker im Nukleotid und Uracil statt Thymin als Base enthält. Die gesamte RNA kann in der Zelle generell in zwei Typen aufgeteilt werden.

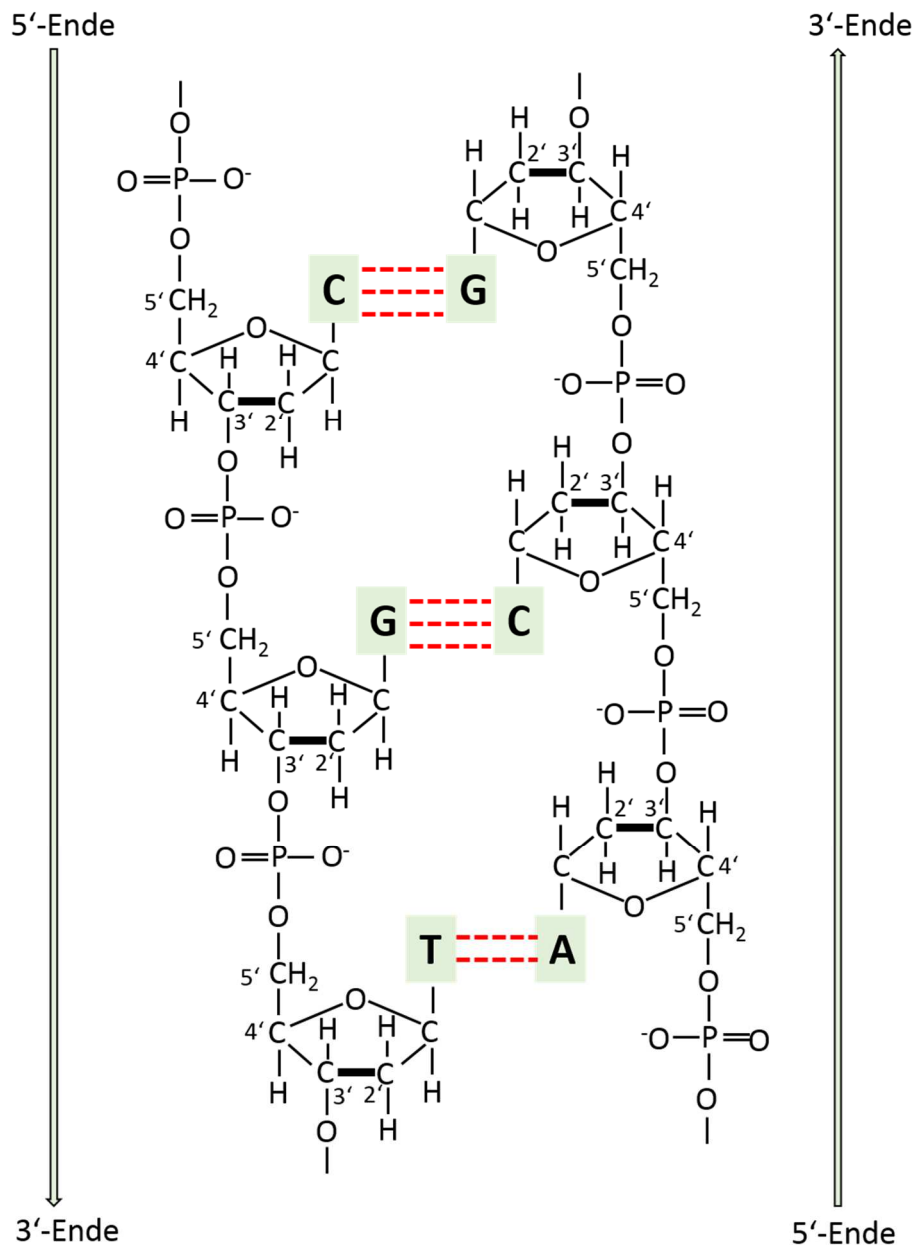


Abb. 2.2: Doppelhelix-Struktur der DNA. Die drei Basenpaare sind grün markiert. Die Wasserstoffbrücken sind mit rot gepunkteten Linien dargestellt.^[32]

Die genetische Information in der DNA wird über Transkription in die kodierende Messenger-RNA (mRNA) übersetzt. Die mRNA wird während der Translation zum Protein umgeschrieben.

Der zweite RNA-Typ umfasst die nicht-kodierende funktionelle RNA. Zu dieser RNA gehören (nach Brown et al.)^[32]:

1. Ribosomale RNA (rRNA) als Bestandteil der Ribosomen;
2. Transfer-RNA (tRNA) bringt die Aminosäuren zu den Ribosomen;
3. kleine Kern-RNA (*small nuclear RNA*, snRNA) zum Spleißen (während der RNA-prozessierenden Vorgänge);
4. kleine nukleoläre RNA (*small nucleolar RNA*, snoRNA) zur Modifikation der rRNA;
5. mikro-RNA (miRNA) und kleine interferierende RNA (*small interfering RNA*, siRNA): regulieren die Expression der Gene.

Die Rolle der siRNA in der Stummschaltung von Genen wird weiter in Kapitel 2.3 erläutert.

2.2 Biokompatibilität und Bioaktivität

Biokompatibilität und Zytotoxizität

Der Begriff und die Definition von Biokompatibilität werden seit mehr als 50 Jahren in der Wissenschaft diskutiert.^[33] Von Williams wurde die Biokompatibilität im Bereich von Biomaterialien in 1987 als „*the ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application*“ definiert.^[34] Später wurde diese Definition ergänzt: „*Biocompatibility refers to the ability of a biomaterial to perform its desired function with respect to a medical therapy, without eliciting any undesirable local or systemic effects in the recipient or beneficiary of that therapy, but generating the most appropriate beneficial cellular or tissue response in that specific situation, and optimising the clinically*

relevant performance of that therapy“.^[35] Williams hebt hervor, dass ein Test zur akuten Zytotoxizität nicht die Biokompatibilität des Systems nachweisen kann. *In-vitro*-Untersuchungen müssen mit *in-vivo*-Experimenten ergänzt werden, um die tatsächliche und eindeutige Biokompatibilität des Materials zu beweisen.^[34] Mit *in-vitro*-Experimenten kann nicht das gesamte komplette System der *in vivo*-ablaufenden Prozesse reproduziert werden. So ist die komplette Charakterisierung von allen möglichen Änderungen im Organismus des Rezipienten *in vitro* unmöglich. Allerdings sind *in-vitro*-Untersuchungen obligatorisch und notwendig, um die Antwort von lebendigen Organismen auf zellulärem Niveau zu testen. Generell kann die biologische Antwort von Biomaterialien *in vitro* qualitativ (z.B. die Aufnahme der Nanopartikel von Zellen) und quantitativ (Proliferation, Differenzierung, Zytotoxizität, Gen-Expression) getestet werden.^[36] Ein wichtiger Parameter bei der Analyse von Nanosystemen *in vitro* ist daher der Zytotoxizitätstest.^[9, 37-39]

Abbildung 2.3 zeigt einige der wichtigsten Parameter, welche in *in vitro* und *in vivo* getestet werden können.

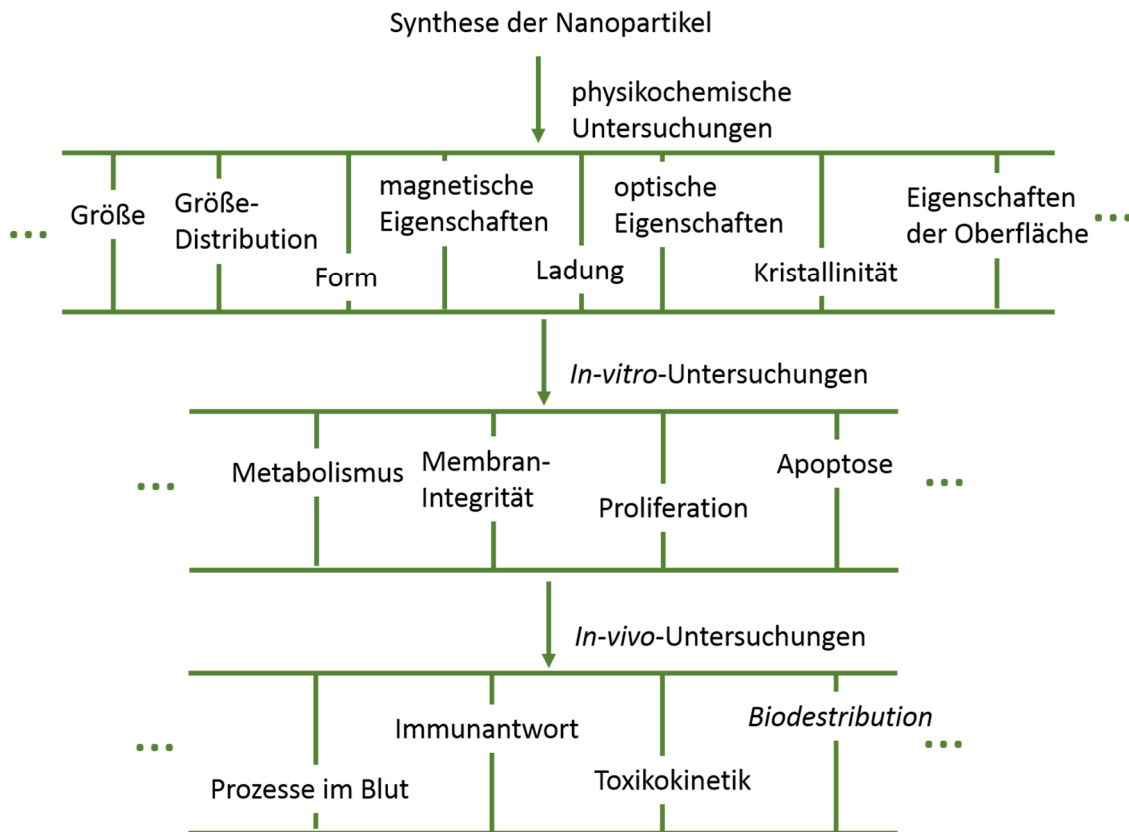


Abb. 2.3: *In-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen der Toxizität und der Biokompatibilität von Nanopartikeln. In Anlehnung an Sharifi *et al.*^[37]

Außerdem müssen für mehrere Nanopartikel (z.B. metallische Silber-Nanopartikel) Genotoxizitäts-Untersuchungen durchgeführt werden.^[40-42] Die Funktionalisierung der Nanopartikel mit unterschiedlichen Molekülen (Polymeren, Proteinen, Nukleinsäuren u.a.) führt zu einem zusätzlichen Einfluss dieser Moleküle auf die gesamte biologische Aktivität des Systems.

Bioaktivität

Generell bedeutet Bioaktivität, wenn man diesen Begriff im Bereich der Knochenimplantation einsetzt, die Fähigkeit des Biomaterials, das Wachstum des Knochengewebes zu stimulieren. Für Knochenersatzmaterialien wurden diese Eigenschaften als osteokonduktiv und osteoinduktiv bezeichnet.^[43] Wenn ein Biomaterial das Wachstum von Knochengewebe des Rezipienten ermöglicht, so

wird es als osteokonduktiv bezeichnet. Die Stimulierung der knochenbildenden Aktivität des Knochengewebes wird als Osteoinduktivität (oder auch „Bioaktivität“) bezeichnet.^[33, 43-44] Um bioaktiv wirkende Materialien zu entwickeln, wurden unterschiedliche Strategien angewendet. Mehrere dieser Strategien basieren auf der Förderung der Knochenwachstumsprozesse durch Biomoleküle, die das Knochenwachstum stimulieren, vor allem durch Wachstumsfaktoren (z.B. *bone morphogenetic proteins* (BMPs) oder durch vaskularisierende Faktoren wie den *vascular endothelial growth factor* (VEGF)).^[13, 16, 43, 45-63]

Die BMPs stellen eine Unterfamilie der *transforming growth factor- β* (TGF- β)-Superfamilie dar, die aus mehr als 20 Proteinen besteht. Manche der BMPs zeigen osteoinduktive Eigenschaften (z.B. BMP-7, BMP-2).^[22] Zu der VEGF-Familie gehören VEGF-A, -B, -C, -D und PlGF-1, -2 (*placental growth factor*). Mehrere davon weisen vaskularisierende Eigenschaften auf.^[64] Die Wachstumsfaktoren können entweder direkt zu den Knochenersatzmaterialien gegeben werden oder auf die Oberfläche des Implantats aufgetragen werden. Diese Faktoren wurden überwiegend in Form von rekombinanten Proteinen klinisch verwendet.^[20, 22-23, 25, 28, 31] Die Nachteile der Verwendung von Wachstumsfaktoren in Form von Proteinen ist, dass sie schnell abgebaut werden können und sich über die umgebenden Gewebe im Körper verteilen.^[21] Jedoch soll so eine physiologisch relevante Konzentration der Proteine am Ziel-Ort erreicht werden.^[19]

Die Gen-Therapie mit einer Wachstumsfaktoren-kodierenden DNA kann eine relativ lange und lokale Proteinexpression am Wirkort ermöglichen.^[12-14, 17, 19, 53, 65-76]

2.3 Transfektion

Transfektion (*gene delivery*, *gene transfer*) umfasst das Einschleusen von exogenem genetischem Material (DNA oder RNA)^[4, 77] in eukaryotische Zellen.^[1, 36, 78] Die Gen-Therapie beruht auf der Transfektion. Um die Produktion der gewünschten Proteine, die von der transfizierten DNA kodiert werden, zu erreichen, müssen mehrere Barrieren überwunden werden.^[79] Abbildung 2.4 zeigt schematisch den Verlauf der DNA-Transfektion als Beispiel des Nanopartikel-basierten Gentransfers. Die Nanopartikel werden durch Endozytose von der Zelle aufgenommen und befinden sich dann im Endosom. Die transportierte Nukleinsäure kann durch lysosomale Enzyme zerstört werden, sodass keine Transfektion möglich ist (rote Pfeile). Die Freisetzung aus den Endosomen ermöglicht den Transport der Nukleinsäure zu den Zellkernen (grüne Pfeile). Im Zytosol jedoch besteht die Gefahr der Degradation der Nukleinsäure (rote Pfeile). Sofern die Plasmid-DNA mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit die Kernmembran penetriert,^[80] bleibt der exakte Prozess des Kern-Eintritts der Plasmid-DNA unklar.^[81] Eine gewisse Rolle beim Penetrieren der Kernmembran spielen NLS (*nuclear localization sequences*).^[82] Einige Forschungen zeigen, dass die Zugabe von NLS zu der Plasmid-DNA oder zu der Fragment-DNA die Akkumulation und Expression des Plasmids stimulieren, was auf den Durchgang des Moleküls durch den NPC (*nuclear pore complex*) hindeuten kann.^[83-84] Die hohe Transfizierbarkeit von sich teilenden im Vergleich zu nicht-teilenden Zellen bestätigt, dass die DNA nukleare Strukturen vorwiegend während der Zellteilung überwinden kann.^[2, 85-90]

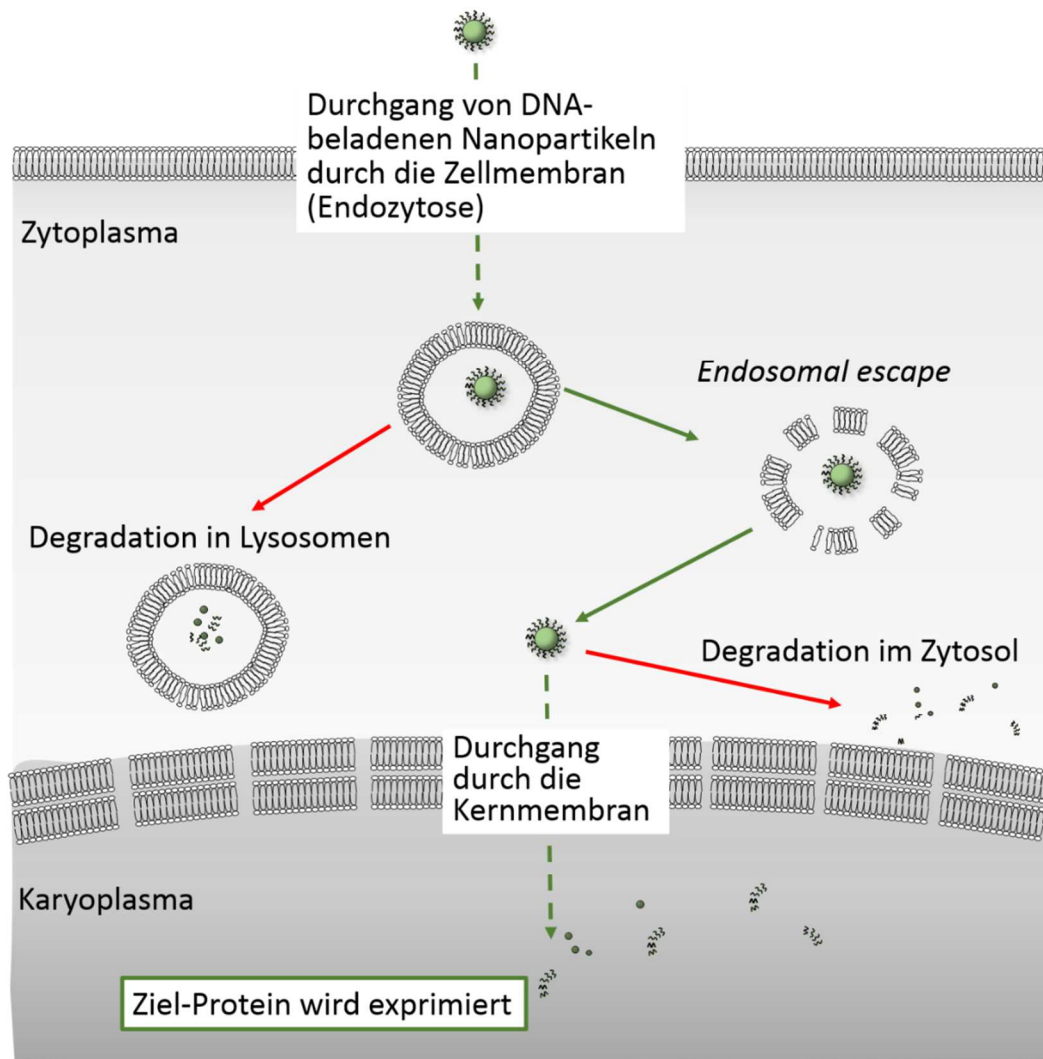


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Transfektion. Die grünen Pfeile zeigen mögliche Richtungen, die zur erfolgreichen Expressierung des Gens und zur Proteinsynthese führen; die roten Pfeile zeigen mögliche Wege, die zur Degradation der DNA führen.

Ein erfolgreiches Eindringen der Nukleinsäure (einzeln oder als Komplex) in das Karyoplasma ermöglicht die Expression des transfizierten Gens, muss dieses aber nicht garantieren. Außerdem kann dies entweder zum Einbau des Gens in das Genom der Zelle (stabile Transfektion) oder zum Ablesen des transfizierten Gens ohne Inkorporation ins Genom (transiente Transfektion) führen.^[4] Bei der stabilen Transfektion existiert das transfizierte Gen in allen Generationen der Tochterzellen.

2.4 Gen-Stummschaltung

Die Gen-Stummschaltung (*gene silencing*) durch eine kleine interferierende RNA (*small interfering RNA*) stellt eine post-transkriptionale Inhibierung der Gen-Expression von spezifischen Proteinen dar. Abbildung 2.5 stellt schematisch den Prozess der Gen-Stummschaltung mit einer kurzen doppelsträngigen siRNA innerhalb der Zelle dar.

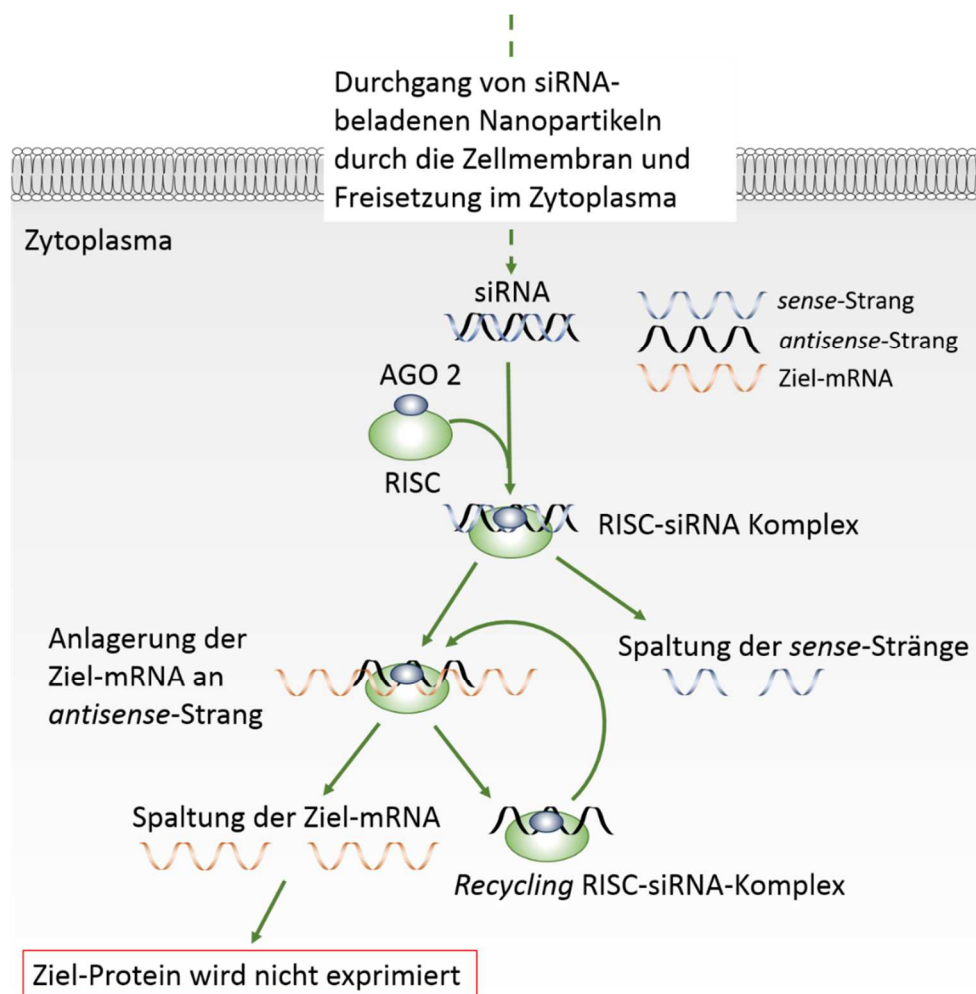


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Mechanismus der Gen-Stummschaltung. In Anlehnung an Whitehead *et al.*^[91]

In der Natur wird die doppelsträngige RNA im Zytoplasma mit Hilfe einer Endoribonuklease, dem sog. „Dicer“, gespalten, sodass die siRNA erhalten wird.^[92] Carthew *et al.* beschreiben die Mechanismen über die die siRNA wirken

kann.^[92] Der hier beschriebene Gen-Stummschaltungs-Prozess basiert auf dem Einbringen von siRNA ins Zytoplasma der Zelle mit Hilfe eines Trägers (z.B. Nanopartikel). Im Allgemeinen kann der weitere Weg von siRNA im Zytosol mit dem oben beschriebenen Weg für DNA verglichen werden. Nach der Freisetzung der siRNA aus Endolysosomen^[93] findet die Einbettung der doppelsträngigen siRNA in die Argonaut (AGO 2)-Einheit und die darauffolgende *sequence*-spezifische Abspaltung des *sense*-Stranges zur Aktivierung des RISC (RNA-induzierter *silencing* Komplex)-Komplexes statt. Dieser Komplex lagert sich an die Ziel-mRNA an, was zu deren Spaltung und zur Inhibition der Synthese des Ziel-Proteins führt.^[94] Die siRNA muss aufgrund der negativen Ladung, welche beim Durchdringen durch die Zellmembran stört und aufgrund der Empfindlichkeit gegen Nukleasen mit Hilfe eines Vektors transportiert werden.^[95] Die für die Transfektion entwickelten Systemen zeigen eine überwiegend gute Effizienz in der Gen-Stummschaltung.^[3, 8, 94, 96-98] Dies liegt an der stummschaltenden Wirkung der siRNA, die im Zytoplasma realisiert wird, so dass keine Integration in den Zellkern benötigt wird, wie dies bei der Transfektion geschehen muss.^[97]

2.5 Gentransfersysteme

Um exogene Nukleinsäuren in die Zelle zu bringen, wurden unterschiedliche Gentransfersysteme entwickelt.^[99] Die Gentransfer-Methoden lassen sich in physikalische (Elektroporation und Mikroinjektion), virale (retrovirale, adenovirale, adeno-assoziierte Vektoren) und nichtvirale (chemische) Methoden unterscheiden.

Physikalische Methoden verfügen über einen direkten Einfluss auf die Zellmembran mit einem elektrischen Puls (Elektroporation)^[100-103] oder über eine

direkte Injektion der DNA in den Innenraum der Zelle.^[80] Allerdings sind diese Verfahren bei den *in-vivo*-Anwendungen begrenzt.^[4]

Die viralen Vektoren bedienen sich der Fähigkeit der Viren durch die Zellmembran zu penetrieren.^[104] Diese Systeme zeigen eine hohe Effizienz *in vitro* und *in vivo*.^[17, 79, 83, 88, 105-110] Allerdings besteht bei *in-vivo*-Anwendungen ein erhebliches Risiko einer immunen Antwort des Rezipient-Organismus auf die virale Behandlung.^[104, 111] Dieser Nachteil sowie auch die kleine Übertragungskapazität des viralen Systems und eine mögliche kanzerogene Wirkung begründen die kritische Einschätzung der Verwendung von viralen Gentransfer-Methoden.^[77, 79] Zu den chemischen, nichtviralen Gentransfer-Methoden gehört die Transfektion mit Hilfe von Liposomen, kationischen Polymeren oder Peptiden, sowie mit anorganischen Nanopartikeln (Abbildung 2.6).^[1, 4, 13, 15, 76-77, 79, 84, 101, 104, 107, 112-126]

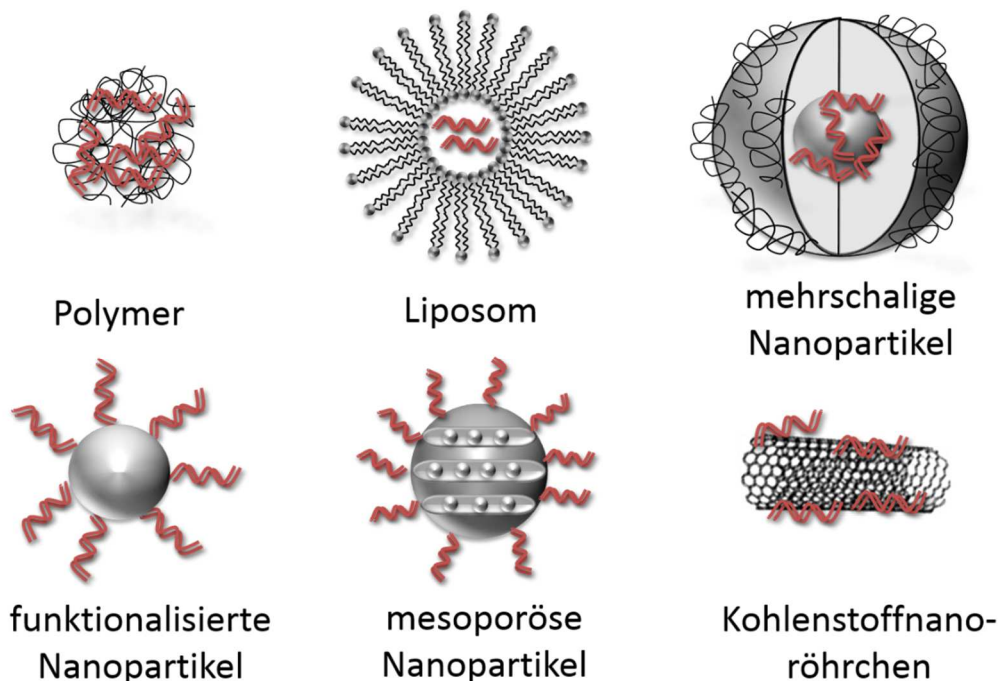


Abb. 2.6: Beispiele von nichtviralen Systemen für den Transport der Nukleinsäuren (gefärbt) in die Zellen. In Anlehnung an Sokolova *et al.*^[4]

Die nichtviralen, chemischen Systeme erfüllen folgende Regeln: Sie haben eine große Oberfläche und können mehrere funktionelle Gruppen verbinden; zudem verfügen sie über eine kontrollierbare Absorption und Freisetzung der Wirkstoffe; des Weiteren können die Größe der Systeme sowie ihre Oberflächen-Charakteristik angepasst werden.^[1, 127]

Liposome, Polymere, Dendrimere

Seit dem Bericht von Felgner *et al.* 1987 über die Verwendung des kationischen Lipids Dioleoyltrimethylammoniumchlorid (DOTMA) für den DNA-Transfer *in vitro* werden die auf Liposomen basierenden Transfektionssysteme häufig *in vitro* und *in vivo* angewendet.^[128] Ein Beispiel stellt kommerziell erhältliches Lipofectamine™ dar. Das kationische Lipofectamine™ zeigt eine hohe Transfektionseffizienz *in vivo*, was allerdings von einer gewissen Zytotoxizität begleitet wird.^[88, 129] Generell bestehen die liposomalen Transfektionssysteme aus kationischen und neutralen Lipiden, so dass die negativ geladenen Nukleinsäuren von kationischen Liposomen übertragen werden können.^[120, 128, 130-131] Die meisten Polymere, die für den Gentransfer eingesetzt werden, tragen eine positive Ladung.^[2, 120-121, 127, 132-133] Diese beruht auf den Aminogruppen, die eine wichtige Rolle in den elektrostatischen Wechselwirkungen mit negativ geladenen Nukleinsäuren und in der Bildung von Polyplexen spielen. Kationische Polyelektrolyte, welche für den Gentransfer verwendet werden, sind unter anderem Polypeptide (wie Polylysin),^[133] Polymere (wie Polyethylenimin),^[88, 112, 126, 134-136] oder Polyaminoether. Die Transfektionseffizienz dieser Systeme ist von der Art des Polymers abhängig. Ein Beispiel dazu ist Polyethylenimin, welches in verzweigter und linearer Form mit unterschiedlichen molaren Massen erhältlich ist, und entsprechende Transfektionseffizienzen und Zytotoxizitäten aufweist.^[136] Eine besondere Gruppe zur Transfektion stellen Dendrimere dar. Der Vorteil im Vergleich zu Polymeren ist die besondere Stabilität der Dendrimer-Nukleinsäure-

Struktur. Polyfect[®], ein kommerziell erhältliches Transfektionsreagenz, ist ein Beispiel für sphärische, kationische Dendrimere.^[2, 79, 137]

Kationische Polymere im Gentransfer verfügen über mehrere Vorteile. Die kompakte Struktur aus Nukleinsäure und kationischem Polymer (oder Dendrimer) schützt die DNA (bzw. RNA) vor der Degradation durch extrazelluläre Enzyme.^[79] Die positive Ladung von diesen kationischen Systemen führt zum Kontakt mit der negativ geladenen Zellmembran. Nach der Aufnahme dieser Struktur von der Zelle befindet sich der Nukleinsäure-Polymer-Komplex im Endosom. Beim Weitertransport des Komplexes zum Zellkern fusionieren die endosomalen Vesikel mit Lysosomen. Dabei bildet sich ein Lysosom aus, welches einen pH-Wert von 4,5-5,5 besitzt und Enzyme enthält. Die Nukleinsäuren werden durch diese Enzyme zerstört. Unterschiedliche Strategien zum sogenannten *endosomal escape* beschreiben, wie die Degradation der Nukleinsäure-Moleküle vermeiden werden kann.^[119, 138-139] Für kationische Lipide wurden *flip-flop*-Mechanismen vorgeschlagen.^[140] Die *proton sponge*-Hypothese beschreibt die Freisetzung von Polymeren (wie PEI) oder Dendrimeren (wie Polyamidoamin) aus Endosomen vor deren Fusionierung mit Lysosomen.^[126, 141-142] Generell ist dieses Phänomen bei mehreren kationischen Polymeren, die eine hohe pH-Puffer-Kapazität besitzen, zu beobachten. Die Membran-verbundene ATPase-Protonenpumpe transportiert Protonen aus dem Zytosol in das Endosom, was zur Erniedrigung des pH-Wertes im Innenraum des Endosoms und zur Aktivierung der hydrolytischen Enzyme führt. Dann wird das Polymer mit *proton sponge*-Eigenschaften protoniert und verhindert einen pH-Abfall im Endosom. Dadurch werden mehr Protonen in das Endosom gepumpt ohne eine Erniedrigung des pH-Werts. Die Ionen-Konzentration wächst und Wasser diffundiert ins Endosom. Infolgedessen wird der osmotische Druck höher, was zur Zerstörung des Endosoms führt und die Freisetzung des Nukleinsäure-Polymer-Komplexes im Zytosol erfolgt.^[126, 138] Die Dissoziation des Nukleinsäure-Polymer-

Komplexes ist bei Durchtritt durch die Kernmembran nicht notwendig. Einige Untersuchungen bestätigen die Lokalisation des DNA/PEI-Komplex im Zellkern.^[135, 143] Wenn der Komplex im Zytosol zerfällt, kann das zum Abbau der Nukleinsäure führen. Die Nuklease, die zur Zerstörung des Plasmids im Zytosol führt, ist noch nicht bekannt.^[81] Allerdings tritt bei Verwendung von kationischen Polymeren für die Zelltransfektion eine gewisse Zytotoxizität auf.^[1]

Anorganische Nanopartikel

Anorganische Nanopartikel stellen eine breite Gruppe als Nukleinsäure-Träger für die Transfektion von Zellen dar. Laut ISO (*International Organization for Standardization*) sind Nanomaterialien als Objekte definiert, welche mindestens in einer Dimension kleiner als 100 nm sind.^[144] Die Nanopartikel stellen eine Art von Nanomaterialien dar. Zu den Nanopartikeln gehören z.B. Kohlenstoff-nanoröhren, Gold-, Silber-, Zinkoxid-, Zinksulfid-, Eisenoxid- sowie Calciumphosphat-Nanopartikel.^[1, 3-4, 99, 115, 145-154] Die wesentlichen Vorteile der anorganischen Nanopartikel in der Zelltransfektion sind die oft einfache Herstellung und geringe Zytotoxizität.^[1, 4] Die Forschungen im Nanopartikel-Bereich sind in den letzten Jahren auf Nanopartikel fokussiert, die mehrere Zwecke erfüllen.^[150, 155-157] Solche Nanopartikel können z.B. für die klinische Diagnostik durch die Markierung von Tumorgewebe, anhand einer Beladung der Nanopartikel mit Farbstoffen oder aufgrund der Natur der Nanopartikel angewendet werden.^[150, 157-158] Weitere Ziele sind die Zerstörung des Tumorgewebes durch Adressierung der Nanopartikel, welche mit tumorspezifischen Antikörpern funktionalisiert werden^[156, 158-163] oder die Therapie mittels *drug delivery* durch Beladung der Nanopartikel mit bioaktiven Molekülen.^[150, 155, 164-167]

2.6 Calciumphosphat-Nanopartikel für den Nukleinsäuren-Transport

Calciumphosphate stellen in unterschiedlichen Formen anorganische Komponenten von verschiedenen Geweben in Lebewesen dar.^[5] So besteht der anorganische Teil des Knochengewebes überwiegend aus Hydroxylapatit in nanokristalliner Form.^[5] Dank seiner Ähnlichkeit mit den natürlichen Calciumphosphaten und die dadurch charakteristische gute Biokompatibilität und Abbaubarkeit stellen die synthetischen Calciumphosphate eines der am häufigsten verwendeten Knochenersatzmaterialien dar.^[5, 59] Tabelle 2.1 zeigt die Calcium/Phosphat-Verhältnisse in unterschiedlichen Modifikationen der Calciumphosphate.^[168]

Nur Calciumphosphate mit einem Ca/P-Verhältnis größer als 1 sind für Implantate anwendbar. Die Löslichkeit der anderen Modifikationen ist zu hoch für *in-vivo*-Anwendungen.^[36] Es werden hauptsächlich Hydroxylapatit, Tricalciumphosphat und Octacalciumphosphat als Knochenersatzmaterialien angesetzt.^[5] Da die Calciumphosphat-Nanopartikel eine gute Biokompatibilität aufweisen, relativ leicht hergestellt und erfolgreich mit Nukleinsäuren funktionalisiert werden können, können Calciumphosphat-Nanopartikel im Bereich von Gentransfer und Gen-Therapie (d.h. für die Transfektion oder für die Gen-Stummschaltung) angewendet werden.

Tab. 2.1: Molare Ca/P-Verhältnisse für unterschiedliche Calciumphosphate.^[168]

Name	Abkürzung	Formel	Ca/P-Verhältnis
Tetracalciumphosphat	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0
Hydroxylapatit	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Tricalciumphosphat	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
Octacalciumphosphat	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1,33
Calciumhydrogenphosphat-Dihydrat (Brushit)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0
Calciumhydrogenphosphat	DCPA	CaHPO_4	1,0
Calciumpyrophosphat (α , β , γ)	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Calciumpyrophosphat-Dihydrat	CPPD	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0
Calciumphosphat-Monohydrat	MCPM	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5

Die Standard-Calciumphosphat-Methode wurde erstmals von Graham und van der Eb 1973 für die Transfektion beschrieben.^[110] Diese Methode basiert auf der *in-situ*-Synthese von Calciumphosphat/DNA-Aggregaten. Einige wichtige Parameter, die für die Ausbildung der Aggregate notwendig sind, wie pH-Wert, Temperatur und Zeit der Präzipitation, müssen bei den Zellkulturbedingungen eingehalten werden, was die Transfektionseffizienz beeinflussen kann. Die kontrollierte Synthese von Calciumphosphat-Nanopartikeln in Form eines Kolloids für den intrazellulären Transport der Nukleinsäuren vermeidet diesen Einfluss. Die unterschiedlichen Calciumphosphat-Nanopartikel, die bereits für den Gentransfer untersucht wurden, sind in mehreren Übersichtsartikeln beschrieben worden.^[1, 3-4, 47, 99, 122, 146, 169-171] DNA-funktionalisierte

Calciumphosphat-Nanopartikel wurden von Sokolova *et al.* hergestellt und charakterisiert.^[172] Ein Modell zur Wechselwirkung zwischen den Calciumphosphat-Nanopartikeln und den Phosphatgruppen der Nukleinsäuren wurde ebenfalls von Sokolova *et al.* beschrieben (Abb. 2.7).^[173]

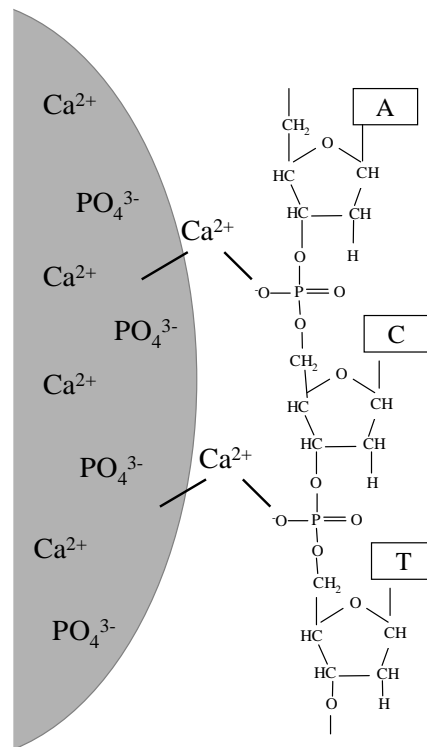


Abb. 2.7: Modell für die Wechselwirkung zwischen der Oberfläche eines Calciumphosphat-Nanopartikels und einer Nukleinsäure nach Sokolova *et al.*^[173]

Eine weitere Schicht an Calciumphosphat schützt die DNA vor Degradation durch Nukleasen und führt zur Erhöhung der Transfektionseffizienz.^[174] Eine zusätzliche Funktionalisierung der Calciumphosphat/Nukleinsäure-Nanopartikel mit kationischem Polymer (z.B. Polyethylenimin) führt zu einer besseren Aufnahme in die Zellen, zu einer erhöhten Transfektionseffizienz (einschließlich *endosomal escape* durch PEI) und zu einer geringen oder keiner Zytotoxizität.^[10] Eine weitere Verbesserung von den PEI-funktionalisierten und DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde durch die Zugabe an Protamin realisiert.^[175] Das Protamin stellt ein kleines (4-10 kDa), Arginin-reiches, positiv

geladenes Protein dar. Durch die positive Ladung kann das Protamin gut die DNA komplexieren, und durch die enthaltenen NLSs (*nuclear localization sequences*) kann die nukleare Membran direkt penetriert werden. Dadurch kann die Transfektionseffizienz der Nanopartikel erhöht werden.^[175] Eine niedrige Zytotoxizität neben einer hohen Transfektionseffizienz des Systems wurde an HeLa- und MG-63-Zellen nachgewiesen.^[175] Vielversprechende Calciumphosphat-Nanopartikel wurden von Kozlova entwickelt.^[176] Mit einem Calciumphosphat/PEI-„Kern“ wurde die Plasmid-DNA elektrostatisch gebunden und mit einer Siliciumdioxid-Schale geschützt. Das Siliciumdioxid ermöglicht eine kovalente Bindung von anderen Molekülen, wie z.B. Antikörpern. Das ermöglicht eine Adressierung (*targeting*) der Nanopartikel *in vivo*. Eine gute Zellaufnahme und hohe Transfektionseffizienz von diesen Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde *in vitro* gezeigt.^[176-177]

Calciumphosphat besitzt osteokonduktive Eigenschaften,^[44] und einige osteogene Effekte für Calciumphosphat-Nanopartikel wurden ebenfalls beschrieben, z.B. für Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel in einer 3D-Kultur auf hMSC in Abwesenheit von Knochenwachstumsfaktoren von Gonzalez-McQuire *et al.*^[178] Diese Tatsache, die relativ leichte Herstellung und Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit biologisch aktiven Molekülen (Nukleinsäuren), die in mehreren Transfektionsuntersuchungen nachgewiesene effektive Transfektion, die hohe Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit stellen die Voraussetzungen für Untersuchungen dieser Nanopartikel in der Behandlung von Knochendefekten *in vivo*, und in weiteren Studien als Bestandteil von Knochenersatzmaterialien mit biologisch aktiven Eigenschaften dar.

2.7 Dispersionskolloide

Als Dispersionskolloide werden physikalisch-chemische als auch thermodynamisch instabile, hydrophobe Kolloide bezeichnet. Die Dispersionskolloide bestehen aus einem Dispersionsmittel (z.B. Wasser) und der dispersen Phase (Teilchen mit einer mittleren Größe zwischen 1 nm und 500 nm). Solche Kolloide können überwiegend als polydispers (breite Größenverteilung) und polyform (unterschiedliche Formen) charakterisiert werden.^[179] Diese Systeme verfügen über eine große Grenzfläche und dadurch über einen großen Überschuss der Gibbs-Energie. Dispersionskolloide altern, indem die größeren Partikel wachsen und die kleineren Partikel verschwinden. Generell beruht die Stabilität von Kolloiden auf der Wechselwirkung zwischen Anziehungs- und Abstoßungskräften der Partikel. Bei Störungen der Stabilität zerfällt das Dispersionskolloid in zwei Phasen (koaguliert). Zur Koagulation kann es aufgrund der Zugabe eines Elektrolyten zum Kolloid oder durch eine Erhöhung der Temperatur kommen. Bei der Koagulation lagern sich die Teilchen zusammen und es können sich Agglomerate ausbilden.

Die DLVO-Theorie (entwickelt von *Derjagin*, *Landau*, *Verwey* und *Overbeek*) beschreibt und erklärt die Stabilität von Dispersionskolloiden.^[180] Die Stabilität von Dispersionen ist durch Oberflächenladungen der Teilchen, die in Form einer elektrochemischen Doppelschicht existieren und zur gegenseitigen Abstoßung der Partikel im Kolloid führen, vorhanden.

Abbildung 2.8 zeigt schematisch und vereinfacht die elektrochemische Doppelschicht um ein kolloidales Partikel. Die diffuse Ladungswolke baut sich symmetrisch um das Partikel auf und bewirkt die abstoßenden Eigenschaften der Kolloide, wenn diese sich auf einen definierten Abstand in der Dispersion nähern.^[179]

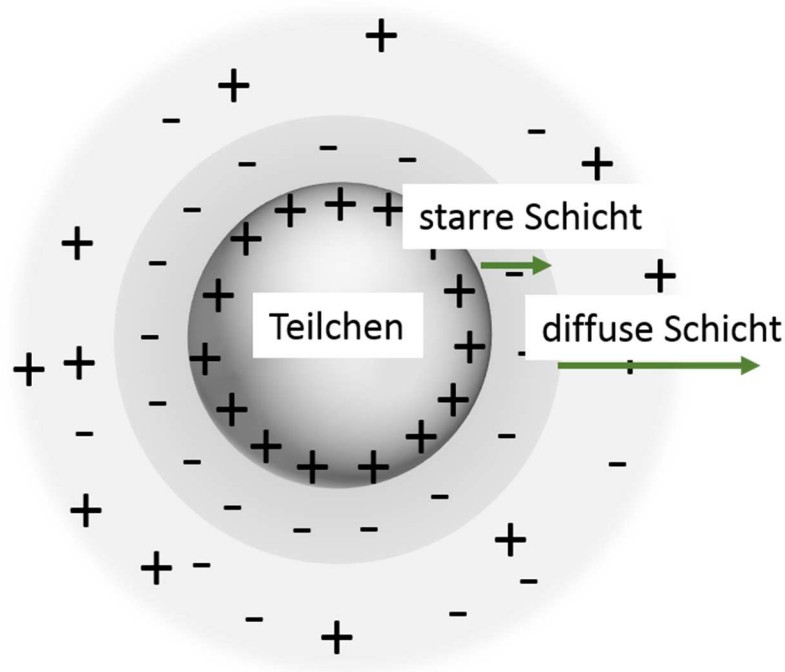


Abb. 2.8: Schematische Darstellung des Ladungsaufbaus um ein kolloidales Teilchen. Anionen sind als „-“ und Kationen sind als „+“ gezeichnet. In Anlehnung an Dörfler.^[179]

Die Stabilität dieser Systeme kann mit Hilfe von Stabilisatoren auf der Oberfläche erhöht werden. Als Stabilisatoren können z.B. Polyelektrolyte oder Tenside dienen. Für ein mit Polymer umhülltes Partikel ist die Stabilität von Art und Menge des Polymers abhängig. Bei einer Stabilisierung mit dem Polymer kann eine Erhöhung von Polymerkonzentration im Kolloid aber auch zur Destabilisierung des Systems führen (Abb. 2.9).

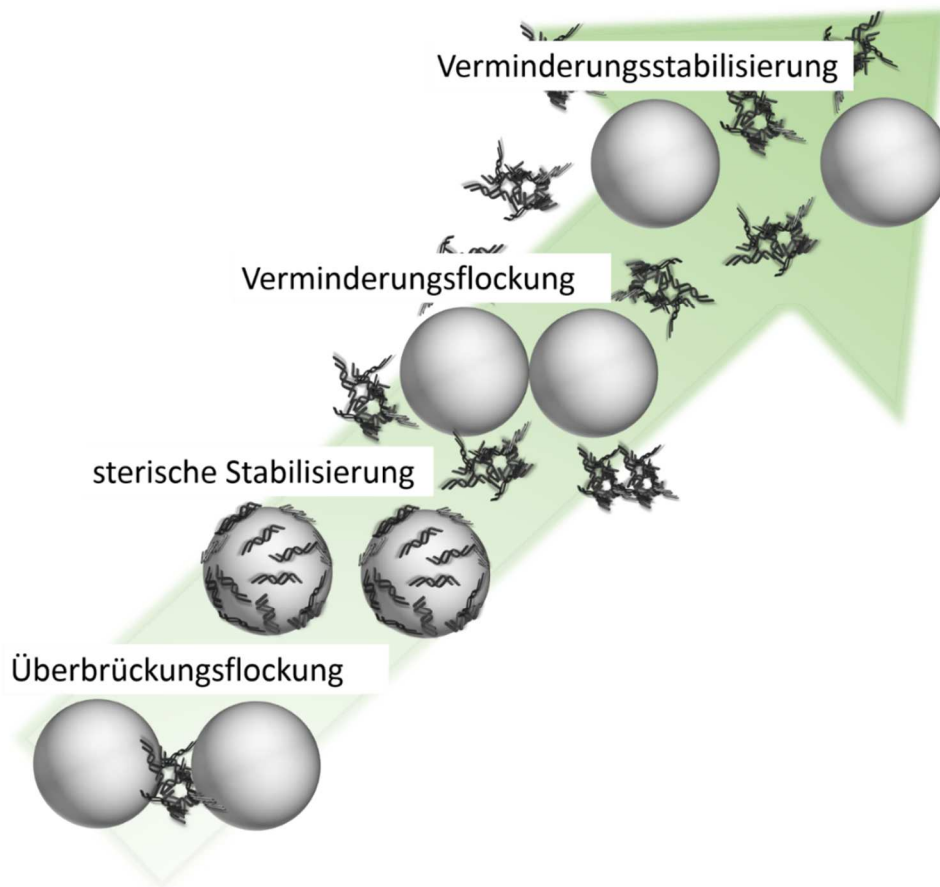


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der Stabilisierungs- und Flockungswirkung von Polymeren mit ansteigender Polymerkonzentration. In Anlehnung an Dörfler.^[179]

Für die Nanopartikel, die in dieser Arbeit beschrieben sind, wurden Nukleinsäuren (DNA oder siRNA) sowie Polyethylenimin als Stabilisatoren verwendet. In beiden Fällen wird eine elektrosterische Stabilisierung erreicht, aufgrund der Phosphatgruppen der Nukleinsäuren bzw. der Aminogruppen von PEI.

Die elektrochemische Doppelschicht besteht aus einer starren Schicht und einer diffusen Schicht (Abb. 2.8). Als quantitative Charakteristik der diffusen Schicht und des Agglomerationsgrades des Systems wird das Zetapotential (ζ -Potential) herangezogen (Abb. 2.10).

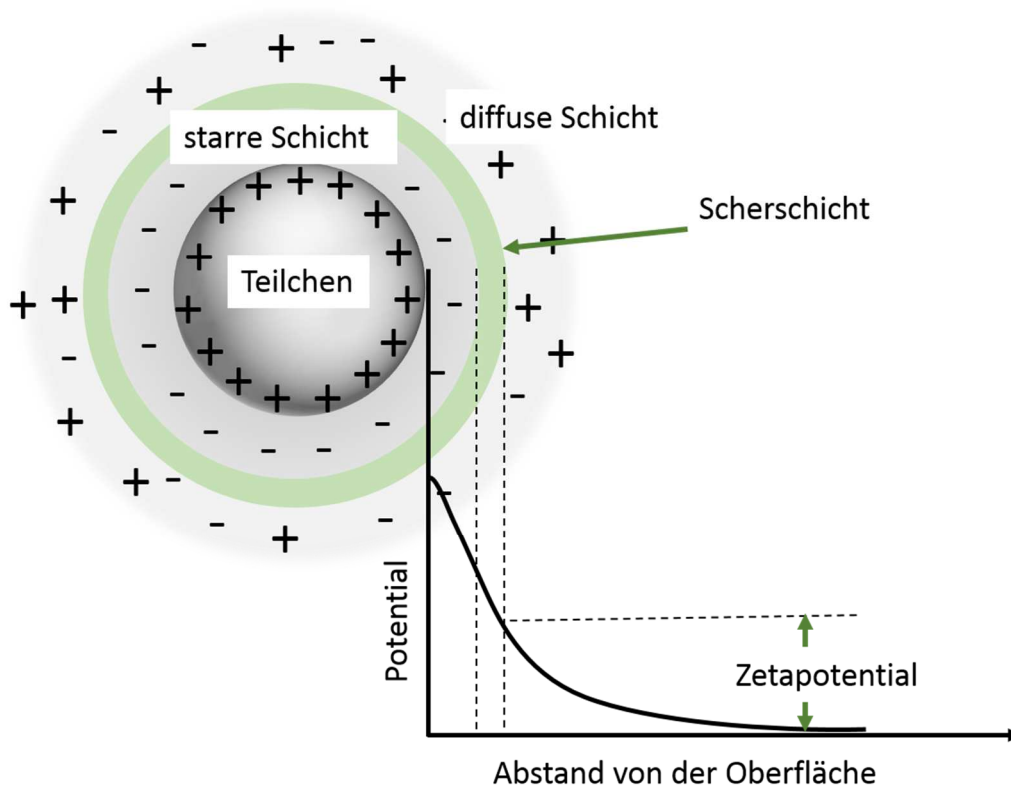


Abb. 2.10: Schematische Darstellung zur Erklärung des Zetapotentials.

Das Zetapotential (oder elektrokinetisches Potential) entsteht an der Gleitebene zwischen den starren und diffusen Schichten in der elektrochemischen Doppelschicht. Als Scherradius wird der Radius der Ladungen, die sich mit dem Partikel bewegen, bezeichnet. Im Bereich der starren Schicht nimmt der Potentialverlauf einen linearen Charakter an, während im diffusen Teil ein exponentieller Abfall zu verzeichnen ist. Die Potentialdifferenz zwischen dem Scherradius und der Volumenphase bildet schließlich das Zetapotential. Ein System ist elektrostatisch stabil, wenn die Zetapotential-Werte positiver als +30 mV oder negativer als -30 mV sind. Die erhaltenen Werte charakterisieren die Oberflächenladung der Nanopartikel in einer wässrigen Dispersion.

3 Materialien und Methoden

3.1 Physikalisch-chemische Methoden

3.1.1 Elektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen wurden an einem ESEM Quanta 400 FEG durchgeführt. Die Proben wurden vorher mit einer dünnen Gold-Palladium-Schicht bedampft. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie könnten hochauflösende Oberflächenabbildungen der Nano-Objekte aufgenommen werden. Die Objektoberfläche wird mit einem Elektronenstrahl im Hochvakuum abgerastert, sodass Informationen über die Topografie der Oberfläche erhalten werden. Niederenergetische Sekundärelektronen können neben rückgestreuten hochenergetischen Elektronen detektiert werden.

3.1.2 Atomabsorptionsspektroskopie

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) diene als Methode für die quantitativen Nachweis der Elemente. In dieser Arbeit wurde die Calcium-Konzentration mithilfe von AAS bestimmen. Für die Analyse muss die Probe atomisiert (in einem Graphitrohr oder in einer Flamme) und mit UV-Licht bestrahlt werden. Die Energie, die bei dem Übergang von Atomen aus dem angeregten Zustand zurück in den stabiler Grundzustand frei wird, wird in Form einer Absorption gemessen und für die Differenz der Intensitäten zwischen ein- und austretendem Strahl zur quantitativen Bestimmung der Elemente verwendet.

3.1.3 Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung (auch *photon correlation spectroscopy*, PCS) wurde als eine Methode zur Bestimmung der Größe von Nanopartikeln verwendet. Die Messungen wurden an dem Zetasizer NanoZS (*Malvern instruments*) durchgeführt. Das Messprinzip basiert auf der Analyse der Brown'schen Bewegung der Objekte. Die Nanopartikel werden bei der Messungen mit einem Laser bestrahlt und die Fluktuations-Intensität des gestreuten Licht wird analysiert.^[181] Die Ergebnisse der Messungen lieferten Daten über den hydrodynamischen Durchmesser und den Polydispersitätsindex (PDI) der Probe. Die PDI-Werte charakterisieren die Monodispersität von Kolloiden, wobei Werte, die größer als 0,3 sind, auf ein polydisperses System hindeuten.

3.1.4 Zetapotential

Das Zetapotential wurde an dem Zetasizer-Gerät (NanoZS, *Malvern instruments*) gemessen. Das Mess-Prinzip basiert auf der elektrophoretischen Mobilität der Nanopartikel und wurde mit Hilfe der Henry-Gleichung beschrieben:

$$U_E = \frac{2\varepsilon \zeta f(ka)}{3\eta} \quad (3.1.1)$$

mit ζ dem Zetapotential, U_E der elektrophoretischen Mobilität, ε der dielektrischen Konstante, η der Viskosität, $f(ka)$ der Henry-Funktion, die für Smoluchowski-Model (wässrige Lösungen) 1,5 ist.

Die Messungen basieren auf der LDV (*laser doppler velocimetry*) Methode.^[181] Wenn das Zetapotential positiver als +30 mV und negativer als -30 mV ist, deutet dies auf ein elektrostatisch stabiles Kolloidalsystem hin.^[181]

3.1.5 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie wurde für die Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren und Polyethylenimin verwendet und mit einem UV/Vis-Spektrophotometer (Cary 300 Bio, Agilent Technologies) durchgeführt. Die Probe wird mit Licht mit einer Wellenlänge von 200 nm bis 800 nm bestrahlt. Die Elektronen in den Valenzorbitalen werden dadurch angeregt, sodass ein Übergang auf ein höheres Energieniveau mit Absorption des Lichts stattfindet. Die Intensitäten bei der Einstrahlung und nach dem Proben-Durchgang werden gemessen. Die Konzentration des gemessenen Stoffes kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt werden:

$$E_{\lambda} = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (3.1.2)$$

Hier ist E_{λ} die Extinktion bei Wellenlänge λ , I_0 die Einstrahlungsintensität, I die Intensität des transmittierten Licht, ε_{λ} der dekadische Extinktionskoeffizient, c die Stoffmengenkonzentration der Messsubstanz, d die Schichtdicke (1 cm für die Standard-Küvette).

Für weiteren Konzentrationsberechnungen wurde eine Kalibrationskurve aufgenommen.

3.1.6 *Nanoparticle tracking analysis* (NTA)

Nanoparticle tracking analysis (NTA) wurde an einem NanoSight-Gerät (LM10 HS) für die Ermittlung der Nanopartikel-Größe durchgeführt. Die NTA-Methode basiert auf der Verfolgung der Brownschen Bewegung der Partikel. Das Gerät fertigt ein Video an, das mittels Software analysiert wird und für die Berechnungen des hydrodynamischen Durchmessers mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung verwendet wird.

3.2 Darstellung von Calciumphosphat-Nanopartikeln und Nanostäbchen

3.2.1 Darstellung von Calciumphosphat/pcDNA3.1(+)- *Firefly*-Luciferase-Nanopartikeln

Die Herstellung von Calciumphosphat-Nanopartikel wurde nach der Methode von Sokolova *et al.*^[10, 172, 174] durchgeführt und ist schematisch in Abbildung 3.2.1 gezeigt.

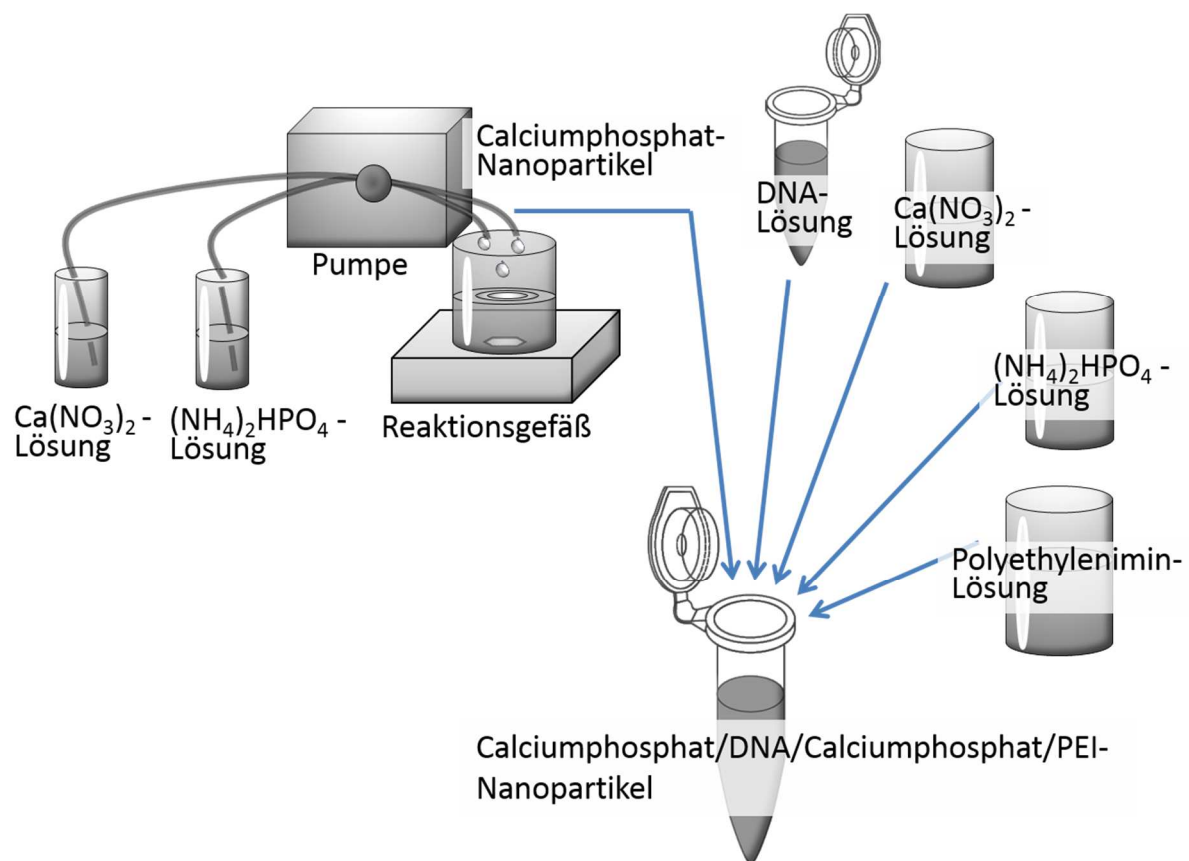


Abb. 3.2.1: Schematische Darstellung der Synthese von PEI-stabilisierten und DNA-beladenen Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikeln.

Vor der Synthese wurden die pH-Werte der Calciumnitrat-Lösung ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6,25 mM) und der Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3,74 mM) auf jeweils 9 eingestellt. Die beiden Lösungen wurden mittels einer peristaltischen Pumpe unter ständiger Rührung gleichzeitig in ein Reaktionsgefäß gepumpt und dort schnell gemischt. Danach wurden 100 μL der unfunktionalisierten Calciumphosphat-Suspension entnommen und in ein Gefäß gegeben. Hierzu wurde 16,7 μL der Luciferase-kodierenden DNA (pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase) mit einer Konzentration von $1,2 \text{ g L}^{-1}$ gegeben. Die synthetisierten einschaligen Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel wurden bei Sokolova *et al.* beschrieben.^[172] Weitere nacheinander folgende Zugabe jeweils 50 μL von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - und $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösungen (Abbildung 3.2.1) führte zur Bildung einer weiteren Calciumphosphat-Schicht um die Nanopartikel.^[172] Die Synthese von dreischaligen DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln (Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA) erfolgte durch die weitere Zugabe 16,7 μL DNA zur Dispersion.

Für die Herstellung von Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikeln wurden 100 μL der unfunktionalisierten Calciumphosphat-Suspension mit 16,7 μL der Luciferase-kodierenden DNA (pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase) mit einer Konzentration von $1,2 \text{ g L}^{-1}$ gemischt. Danach folgte die Zugabe jeweils 50 μL von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - und $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösungen. Im letzten Schritt die Synthese wurden 5, 10 oder 50 μL des PEIs (verzweigt, 25 000 Da, $c=2 \text{ g L}^{-1}$, Sigma) beigelegt. Die PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden entsprechend dem PEI-Anteil als Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,05)-Nanopartikel, Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,1)-Nanopartikel und Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,5)-Nanopartikel bezeichnet.^[10, 174]

Für die Synthese von DNA/PEI-Polplexen als Kontrolle wurde die Calciumphosphat-Suspension durch entsprechenden Volumina an Wasser ersetzt.

100 μL des Wassers wurden mit 16,7 μL der Luciferase-kodierenden DNA (pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase) mit einer Konzentration von $1,2 \text{ g L}^{-1}$ gemischt. Zu der DNA-Lösung im Wasser wurden 100 μL Wasser und 5, 10 oder 50 μL PEI gegeben. Diese Polyplexen werden als DNA/PEI(0,05), DNA/PEI(0,1) und DNA/PEI(0,5) bezeichnet.

3.2.2 Darstellung von Calciumphosphat/pcDNA3-eGFP (siRNA)-Nanopartikeln

Die Calciumphosphat/DNA(siRNA)/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel wurden nach dem in Abbildung 3.2.1 beschriebenen Schema synthetisiert. Dafür wurden die pcDNA3-eGFP-Lösung (1 g L^{-1}), die siRNA-Lösung (1 g L^{-1}) und die PEI-Lösung (verzweigt, 25 000 Da, 2 g L^{-1}) verwendet. Die Calciumnitrat-Lösung ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6,25 mM) und der Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3,74 mM) wurden mittels einer peristaltischen Pumpe unter ständiger Rührung gleichzeitig in ein Reaktionsgefäß gepumpt und zusammengemischt. Davon wurden 300 μL entnommen und mit 60 μL der DNA (oder siRNA)-Lösung gemischt. Zu diesen Calciumphosphat/DNA (siRNA)-Nanopartikeln wurden nacheinander 150 μL der Calciumnitrat-Lösung ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6,25 mM), 150 μL der Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3,74 mM) und dann 300 μL PEI-Lösung gegeben. Um die Nukleinsäure-funktionalisierten Nanopartikel mit PEI in der äußeren Schale von freien Nukleinsäure/PEI-Polyplexen und überschüssigem PEI abzutrennen, wurden die Nanopartikel durch Zentrifugation (5 000 g, 4 °C, 15 min) gereinigt. Die wasserlöslichen Nukleinsäure/PEI-Komplexe blieben nach der Zentrifugation im Überstand und wurden von Niederschlag abgetrennt. Der Niederschlag wurde in 480 μL an sterilem Reinstwasser mithilfe eines Ultraschallfingers (Sonotrode 2; 80 % Amplitude, Pulse 0,8) 10 s dispergiert. Bei der Synthese von

Calciumphosphat/siRNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikeln wurden die Nanopartikel bei 20 000 g und bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in einem äquivalenten Volumen von sterilem Reinstwasser aufgenommen und mithilfe des Ultraschallfingers (Sonotrode 2; 80 % Amplitude, Pulse 0,8) für 10 s dispergiert.

3.2.3 Synthese von Calciumphosphat/pcDNA3-eGFP (siRNA)-Nanostäbchen

Für die Herstellung von Calciumphosphat-Nanostäbchen wurde 1 g einer 6%igen Ostim®-Dispersion (enthält 60 mg Hydroxylapatit; aap, Dieburg, Deutschland) mit Reinstwasser auf 20 mL aufgefüllt. Danach wurden 2 mL von dieser Suspension weiter mit 3 mL Reinstwasser und mittels Ultraschallgerät (Sonotrode 7, Amplitude 50 %, Pulse 0,8) für 1 min dispergiert. Für eine Funktionalisierung mit DNA (*herring sperm*, < 50 bp, 1 g L⁻¹, Sigma) wurden 5 mL der DNA-Lösung mit 5 mL der Nanostäbchen-Suspension gemischt und mit Ultraschall für 30 s dispergiert. Für die Transfektionsuntersuchungen wurden 0,25 mL der pcDNA3-eGFP-Lösung (1 g L⁻¹) mit 0,25 mL der Nanostäbchen-Suspension gemischt.

Für die Gen-Stummschaltungs-Experimente wurde 1 g der 6 % Ostim®-Dispersion in Reinstwasser auf 20 mL aufgefüllt. Danach wurden 75 µL von dieser Suspension mit 112 µL Reinstwasser verdünnt und mit 63 µL siRNA-Lösung (anti-eGFP, 350 mM, 4,9 mg mL⁻¹) gemischt. Die Dispergierung mit dem Ultraschall dauerte 15 s mit Sonotrode 1 mit der Amplitude von 60 % und einer Pulsstärke 0,8. Die Synthese der Calciumphosphat/pcDNA3-eGFP(siRNA)-Nanostäbchen wurde von Herrn Dr. Jan Klesing durchgeführt.

3.2.4 Darstellung von Calciumphosphat/PEI/pcDNA3-eGFP (siRNA)-Nanostäbchen

Für die Synthese von PEI-beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen wurde 1 g einer 6%igen Ostim[®]-Dispersion in Reinstwasser auf 20 mL aufgefüllt. Danach wurden zu 2 mL dieser Suspension 18 mL der PEI-Lösung (verzweigt, 25 000 Da, 2 g L⁻¹) zugegeben und für 3 min mit Ultraschall (Sonotrode 7, 50 % Amplitude, 0,8 Puls) dispergiert. Diese Suspension wurde für 30 min bei 66 000 g zentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag wurde in einem äquivalenten Volumen an Reinstwasser suspendiert und bei gleichen Parametern für 2 min mit dem Ultraschallfinger dispergiert. Die Hydroxylapatit-Konzentration lag bei 0,3 mg mL⁻¹. Für eine Funktionalisierung mit pcDNA3-eGFP (1 g L⁻¹) wurde 1 mL dieser Suspension mit 6,25 µL, 12,5 µL, 18,8 µL, 25 µL, 31,3 µL, 37,5 µL, 62,5 µL, 75 µL, 125 µL, 150 µL, 200 µL, 250 µL oder 350 µL der DNA versetzt. Für die Funktionalisierung der Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen mit siRNA wurden zu 1 mL der Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen 1,28 µL, 2,55 µL, 3,84 µL, 5,10 µL, 6,39 µL, 7,65 µL, 10,2 µL, 12,8 µL, 15,3 µL, 25,5 µL, 30,6 µL, 40,8 µL, 51,0 µL oder 71,4 µL der siRNA-Lösung (anti-eGFP, 350 µM, 4,9 mg mL⁻¹) gegeben.

Die Synthese der Calciumphosphat/PEI/pcDNA3-eGFP(siRNA)-Nanostäbchen wurde von Herrn Dr. Jan Klesing durchgeführt.

3.2.5 Darstellung von Calciumphosphat/PEI/pcDNA3-eGFP (siRNA)/PEI-Nanostäbchen

Die Synthese des Calciumphosphat/PEI-„Kerns“ der Nanostäbchen entspricht der Darstellung von Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen, die in Kapitel 3.2.4 beschrieben wurden. Für Zelluntersuchungen wurden 108 µL der pcDNA3-

eGFP-Lösung mit 600 μL Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen-Dispersion gemischt, 30 min inkubiert und mit 40 μL PEI-Lösung (verzweigt, 25 000 Da, 2 g L^{-1}) umgeladen.

Für die Herstellung von Calciumphosphat/PEI/siRNA/PEI-Nanostäbchen für die Gen-Stummschaltung wurden 10 μL der siRNA (350 μM , 4,9 g L^{-1}) zu 300 μL der Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen (Kapitel 3.2.4) gegeben und nach 30 min mit 20 μL PEI-Lösung (verzweigt, 25 000 Da, 2 g L^{-1}) umgeladen.

Die Synthese der Calciumphosphat/PEI/pcDNA3-eGFP(siRNA)/PEI-Nanostäbchen wurde von Herrn Dr. Jan Klesing durchgeführt.

3.2.6 Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel und Calciumphosphat-Nanostäbchen für die Transfektion der BMP-7- und der VEGF-A-kodierender DNA

Die Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel und Nanostäbchen (Kapitel 4.4), erfolgte mit einem BMP-7- und mit einem VEGF-A kodierenden Plasmid (BMP-7-pCMV6-XL4, VEGF-A-pCMV6-XL5, 1 g L^{-1}) und PEI (verzweigt, 25 000 Da, 2 g L^{-1}). Die Herstellung von Calciumphosphat/DNA-, Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA- und Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,1)-Nanopartikeln erfolgte nach dem Schema in Abbildung 3.2.1. Die Calciumnitrat-Lösung ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6,25 mM) und die Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3,74 mM) wurden mittels einer peristaltischen Pumpe unter ständiger Rührung gleichzeitig in ein Reaktionsgefäß gepumpt und zusammengemischt. Davon wurden 100 μL entnommen und mit 20 μL von DNA-Lösung gemischt. Diese Calciumphosphat-Nanopartikel werden als Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel bezeichnet. Für die Synthese von Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln wurden zu diesen Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln nacheinander 50 μL der

Calciumnitrat-Lösung ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6,25 mM), 50 μL der Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3,74 mM) und dann 20 μL DNA-Lösung gegeben. Für die Synthese von Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,1)-Nanopartikeln wurden zu den Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln nacheinander 50 μL der Calciumnitrat-Lösung ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6,25 mM), 50 μL der Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3,74 mM) und dann 10 μL PEI-Lösung gegeben. Die Synthese von Calciumphosphat/PEI/DNA- und Calciumphosphat/PEI/DNA/PEI-Nanostäbchen wurden bereits in Kapitel 3.2.4 bzw. 3.2.5 beschrieben. Die Synthese der Calciumphosphat/PEI/DNA- und Calciumphosphat/PEI/DNA/PEI-Nanostäbchen wurde von Herrn Dr. Jan Klesing durchgeführt.

3.2.7 Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit der hBD-3-kodierender DNA funktionalisiert wurden

Die Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel (Kapitel 4.5) wurde mit dem hBD-3-kodierender Plasmid (hBD-3-pCMV6-AC-GFP, 1 g L⁻¹) und PEI (verzweigt, 2 000 Da, 2 g L⁻¹) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Herstellung von Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikeln erfolgte nach dem Schema in Abbildung 3.2.1. Die Calciumnitrat-Lösung ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6,25 mM) und die Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3,74 mM) wurden mittels einer peristaltischen Pumpe unter ständiger Rührung gleichzeitig in ein Reaktionsgefäß gepumpt und gemischt. Davon wurden 100 μL der unfunktionalisierten Calciumphosphat-Suspension entnommen und mit 20 μL der hBD-3-kodierender Plasmid (hBD-3-pCMV6-AC-GFP) mit einer Konzentration von 1 g L⁻¹ gemischt. Danach folgte die Zugabe jeweils 50 μL von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - und $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösungen. Hierzu wurden 50, 100 oder 200 μL der PEI-Lösung zugegeben. Die PEI-stabilisierten Calciumphosphat-

Nanopartikel wurden als Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,5)-Nanopartikel, Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/ PEI(1)-Nanopartikel und Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(2)-Nanopartikel bezeichnet. Für die Synthese von DNA/PEI-Polyplexen als Kontrolle wurden die Calciumphosphat-Suspension, die Calciumnitrat- und die Ammoniumhydrogenphosphat-Lösungen durch entsprechende Volumina an Wasser ersetzt. 100 μL des Wassers wurden mit 20 μL der hBD-3-kodierender Plasmid (hBD-3-pCMV6-AC-GFP) mit einer Konzentration von 1 g L^{-1} gemischt. Zu der DNA-Lösung im Wasser wurden 100 μL Wasser und 50, 100 oder 200 μL PEI gegeben. Diese Polyplexen wurden als DNA/PEI(0,5), DNA/PEI(1) und DNA/PEI(2) bezeichnet.

3.3 Bestimmung der Konzentrationen von Nanopartikeln und Nanostäbchen

Die Konzentrationen von Nanopartikeln und Nanostäbchen in den Kolloiden wurden nach Sokolova *et al.* berechnet.^[6] Die Konzentrationen von Calciumphosphat wurden für nicht gereinigte Nanopartikel theoretisch aus den Ausgangskonzentrationen des Calciums berechnet. Für gereinigte Nanopartikel erfolgten die Berechnungen entsprechend der mittels AAS-bestimmten Calcium-Konzentrationen. Das molare Calcium/Phosphat-Verhältnis der Kolloide wurde als das Calcium/Phosphat-Verhältnis von stöchiometrischen Hydroxylapatit (1,67) angenommen.

Die Anzahl der Nanopartikel wurde als

$$N(NP) = \frac{m(\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6)}{m(NP)} \quad (3.3.1)$$

berechnet. $N(NP)$ ist die Anzahl der Nanopartikel pro m^3 , $m(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)$ ist die Masse von allen Nanopartikeln pro m^3 , und $m(NP)$ ist die Masse des einzelnen Calciumphosphat-Nanopartikels.

Für sphärische Nanopartikel wurde die Masse als

$$m(NP) = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r(NP)^3 \cdot \rho(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6) \quad (3.3.2)$$

berechnet. $\rho(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)$ ist die Dichte des Calciumphosphats (Hydroxylapatit) und beträgt 3140 kg m^{-3} , r ist der Radius eines Calciumphosphat-Nanopartikels. Der durchschnittliche Nanopartikel-Durchmesser wurde anhand der REM-Aufnahmen mithilfe von *ImageJ* ermittelt. Daher konnte die Konzentration der Nanopartikel für die sphärischen Calciumphosphat-Nanopartikel berechnet werden:

$$N(NP) = \frac{3 \cdot m(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)}{4 \cdot \pi \cdot r(NP)^3 \cdot \rho(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)} \quad (3.3.3)$$

Für Calciumphosphat-Nanostäbchen (NS), die eine charakteristische zylindrische Form besitzen, wurde die Masse $m(NS)$ nach folgender Gleichung bestimmt

$$m(NS) = \pi \cdot r(NS)^2 \cdot h(NS) \cdot \rho(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6), \quad (3.3.4)$$

wobei die mittlere Länge der Nanostäbchen $h(NS)$ und der Radius $r(NS)$ anhand der REM-Aufnahmen mithilfe von *ImageJ* ermittelt wurden.

Die Anzahl der zylindrischen Nanostäbchen pro m³ der Kolloide wurde wie folgt berechnet:

$$N(NS) = \frac{m(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)}{\pi \cdot r(NS)^2 \cdot h(NS) \cdot \rho(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)} \quad (3.3.5)$$

3.4 Berechnungen von DNA-, siRNA- und PEI-Konzentrationen

Die Nukleinsäure-Konzentrationen in den Kolloiden wurden mit UV/Vis-Spektrophotometrie gemessen. Für DNA-Messungen wurde die Absorption der DNA bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Für RNA-Messungen wurde bei der Synthese von Nanopartikel AlexaFluor-555-markierte siRNA benutzt (siRNA-AF-555, Invitrogen™, Paisley, UK). Dafür wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 555 nm gemessen. Für die Bestimmungen der PEI-Konzentration wurde Fluorescein-markiertes Polyethylenimin (PEI-FITC, 2 g L⁻¹, 25 000 Da, LD 1:100, Surflay Nanotec) für die Synthese von Nanopartikeln verwendet. Die UV/Vis-Messungen erfolgten bei einem Maximum der Absorption des FITC bei 497 nm. Zuvor wurde eine Kalibrationskurve aufgenommen.

3.5 Biologische Experimente

3.5.1 Eukaryotische Zellen

Alle Experimente mit eukaryotischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. In dieser Arbeit wurden HeLa-, T24-, MG-63-, HeLa-eGFP- und hMSCs-Zellen verwendet. Das für die Kultivierung der HeLa- und MG-63-Zelllinien benutzte DMEM-Zellkulturmedium mit 10 % FBS besteht aus DMEM, 10 % (V/V) FBS, 100 U mL⁻¹ Penicillin, 100 µg mL⁻¹ Streptomycin.

Für HeLa-eGFP-Zellen wurde das gleiche Zellkulturmedium mit dem zusätzlichen Antibiotikum Geneticin (50 µg mL⁻¹ Geneticin) verwendet.

Das für die Kultivierung der T24-Zelllinie benutzte RPMI 1640 Zellkulturmedium mit 10 % FBS besteht aus RPMI, 10 % (V/V) FBS, 100 U mL⁻¹ Penicillin, 100 µg mL⁻¹ Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

Die hMSCs wurden in MSCGM™ kultiviert. Das verwendete Medium besteht aus 440 mL des hMSC-Basalmediums und zusätzlichen Wachstumsfaktoren: 50 mL *mesenchymal stem cell growth supplement* (MCGS), 10 mL L-Glutamin und 0,5 mL GA-1000 (*gentamicin sulfate amphotericin-B*).

Alle Zellen wurden bei 37 °C in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

Passagieren Zellen

Die Zellen wurden nach dem Erreichen der 80-90 % Konfluenz sowie vor dem Experiment in der Zellkulturflasche (T75 oder T25) passagiert. Dabei wurde das Zellmedium abgesaugt, und die Zellen wurden mit 5 mL (T25) oder 10 mL (T75) warmer phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) zweimal gewaschen. Danach wurden die adhärenenten Zellen mit 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung (500 µL bzw. 1 mL) 5-10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ ausgesetzt, um die Zellen vom Boden zu

lösen. Die Zellsuspension wurde danach mit Zellkulturmedium verdünnt und in ein 15 mL Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden bei 900 rpm für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand von den Zellen abgesaugt und die Zellen wurden wieder im geeigneten Zellkulturmedium dispergiert. Zur Bestimmung der Zellzahl (Anzahl der Zellen pro mL Zellkulturmedium) wurden die Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Zellkammer gezählt. Die benötigte Zahl der Zellen wurde in eine neue Zellkulturflasche gegeben und bei Zellkulturbedingungen kultiviert.

Kryokonservierung und Auftauen den eukaryotischen Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen (HeLa, T24, MG-63 und HeLa-eGFP) wie oben beschrieben kultiviert und gesammelt. Das Medium für die Kryokonservierung besteht aus DMEM, 100 U mL⁻¹ Penicillin, 100 µg mL⁻¹ Streptomycin, 10 % (V/V) FBS und 10 % (V/V) des penetrierenden Kryoprotektors DMSO. Das Medium mit DMSO musste tropfenweise zu den Zellen zugegeben und vorsichtig gemischt werden. Die Kryo-Röhrchen mit den Zellen wurden 24 h lang bei -80 °C gelagert und danach in ein Gefäß mit flüssigem Stickstoff überführt.

Um die Zellen aufzutauen, wurde das Kryo-Röhrchen mit den Zellen im Wasserbad bei 37 °C für einige Minuten inkubiert. Nach der kompletten Auflösung des Eises wurde das Zellkulturmedium tropfenweise langsam zu der Zellsuspension zugegeben. Die Zellen wurden bei 900 rpm 3 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert und weiter bei Zellkulturbedingungen kultiviert.

Die hMSCs wurden nach den Empfehlungen des Herstellers eingefroren. Das Medium für Kryokonservierung der hMSCs bestand aus 70 % (V/V) des hMSC-Basalmediums, 10 % (V/V) DMSO und 20 % (V/V) FBS. Dieses Medium wurde steril filtriert, vorsichtig zu den Zellen gegeben und gemischt. Weiter wurden die Zellen nach dem Standard eingefroren.

3.5.2 Bakterien

In dieser Arbeit wurden gramnegative *E. coli* verwendet. Für alle Versuche wurde LB-Medium hergestellt (20 g L^{-1}) und durch Autoklavierung sterilisiert. Für LB/Agar-Medium wurde ein Liter 20 g L^{-1} LB-Medium mit 15 g Agar gemischt und autoklaviert. Für LB-Ampicillin-Platten (Endkonzentration des Ampicillins betrug 100 g L^{-1}) wurde Ampicillin zusätzlich zum autoklavierten LB-Agar-Medium zugegeben. Für die Aufbewahrung der Bakterien bei -80°C wurde eine sterile 50% (V/V) Glycerin-Lösung verwendet.

Bakterientransformation

Für die Plasmid-DNA Herstellung wurden die Bakterien in einen kompetenten Stand transformiert. Dafür wurden 200 mL LB-Medium mit 2 mL Übernachtskultur eingimpft. Die Bakterien wachsen bis $\text{OD}_{600 \text{ nm}} \approx 0,4$. Danach wurden die Bakterien am Eis für 10 min inkubiert und 7 min lang bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskalter steriler Lösung (10 mM PIPES; 60 mM CaCl_2 ; 15% (V/V) Glycerol) suspendiert und wieder für 5 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 2 mL der gleichen eiskalten Lösung suspendiert und davon $70 \mu\text{L}$ in Gefäße für die Langzeit-Lagerung aliquotiert. Die hergestellten kompetenten *E. coli* wurden transformiert und weiter für die Präparation des Plasmids verwendet. Für die Transformation wurden $70 \mu\text{L}$ der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 300 ng Plasmid-DNA für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock dauerte 45 s bei 42°C . Danach wurden die Bakterien auf Eis zwei Minuten lang inkubiert. Das LB-Medium ($500 \mu\text{L}$) wurde in dieses Gefäß übertragen und gemischt. Danach folgten eine 30-minütige Inkubation bei 37°C und Ausplattierung der Bakterien auf LB-Agar mit Ampicillin. Die LB-Agar-Platten mit Ampicillin-resistenten

Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C gelagert. Die hergestellten Bakterien wurden eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Plasmidisolation mit Hilfe eines Giga-Kits

Die Plasmide wurden nach dem Standardprotokoll des Herstellers (Macherey-Nagel) präpariert. Dafür wurde eine Vorkultur von reprogrammierten *E. coli* vorbereitet. Zu den 20 mL LB-Medium wurden 20 µL Ampicillin (100 g L⁻¹) zugegeben und mit eine Bakterienkolonie (oder Bakterien aus der Glycerindauerkultur) geimpft. Am nächsten Tag wurde diese Vorkultur mit 2 L LB-Medium und 2 mL Ampicillin-Lösung (100 g L⁻¹) in sterile Erlenmeyerkolben gegossen und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Danach folgte die DNA-Präparation nach der Angabe des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in reinem Endotoxin-freien Wasser suspendiert. Die DNA-Konzentration wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt.

3.5.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

EGFP- und GFP-Expression

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden für die Bestimmung der Effizienz der Transfektion von eGFP- und GFP-kodierender DNA (pcDNA3-eGFP und hBD-3-pCMV6-AC-GFP) sowie bei den Gen-Stummschaltungs-Experimenten an lebenden, zweimal mit PBS gewaschenen Zellen durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einem FITC-Filter (Anregung 470 nm und Emission 535 nm) und bei normalem Licht (Phasenkontrast) gemacht. Innerhalb eines Experimentes wurden Zellaufnahmen bei gleichen Bedingungen durchgeführt.

Nanopartikel-Aufnahme von Zellen

Für die Experimente zur Zellaufnahme von Nanopartikeln wurden die Zellen mit Nanopartikel 4 oder 5 h lang bei 37 °C in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellmembran wurde mit Hilfe der *CellMask*-Lösung (*CellMaskTMDeep Red plasma membrane stain*) mit der Konzentration 5 µg mL⁻¹ bei 37 °C für 15 min angefärbt und danach mit PBS gewaschen. Mit 3,7 % (V/V) Paraformaldehyd-Lösung wurden die Zellen fixiert und danach dreifach mit PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI (1 µg mL⁻¹) angefärbt. Die Zellen wurden mit Hilfe des Keyence-Mikroskops aufgenommen.

Time-lapse Mikroskopie

Time-lapse-Experimente wurden an den HeLa- und HeLa-eGFP-Zellen mit Hilfe einer Inkubationskammer (INUG2EF-KI4, TokaiHit/Keyence, Mechelen, Belgien) an dem Keyence-Mikroskop durchgeführt. Die Inkubationskammer gewährte die optimalen Zellkulturbedingungen mit 37 °C und 5 % CO₂. Für die *time-lapse*-Untersuchungen der Transfektion wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert und mit 1,5·10⁴ Zellen pro cm² in einer 4-Well Kammer ausgesät.

Für die Gen-Stummschaltungs-Experimente wurden die stabil transfizierten HeLa-eGFP Zellen (1,4·10⁴ Zellen pro cm²) in einer 8-Well Kammer verwendet. Nach 24 h wurden die Calciumphosphat-Nanopartikel zu den Zellen gegeben. Als Positivkontrolle dienten die mit LipofectamineTM transfizierten Zellen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Aufnahme von mit Nanopartikel transfizierten Zellen sowie von Positiv- und Negativkontrolle fand parallel statt. Mit Hilfe der Software („BZ-II-Viewer“) wurden alle Bedingungen

des Experiments eingestellt (Belichtungszeit, Filter, Aufnahmestellen, Aufnahmeintervall und Anzahl der Aufnahmen).

Die *time-lapse*-Untersuchungen der Transfektion dauerte 72 h und wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: 20× Objektiv; Belichtungszeiten 1/20 s (FITC-Filter) und 1/7 s (Phasenkontrast); 4 Stellen pro Probe; 73 Fotos; ein Foto pro Stunde. Die *time-lapse*-Untersuchungen der Gen-Stummschaltung wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: 20× Objektiv; 1/100 s (FITC-Filter) und 1/35 s (Phasenkontrast); 4 Stellen pro Probe; 73 Fotos; ein Foto pro Stunde. Nach 7 h wurde das Zellkulturmedium durch frisches Medium ersetzt.

3.5.4 Transfektion von Zellen

Etwa 12-24 h vor der Transfektion wurden $2,5 \cdot 10^4$ oder $5 \cdot 10^4$ Zellen in einem Well der 24-Well Platte ausgesät. Die Nanopartikel und die Kontrolle wurden zu den Zellen gegeben. Nach 7 h wurde das Zellmedium abgesaugt und durch ein frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Transfektionseffizienz wurde 48 oder 72 h nach der Zugabe von Nanopartikeln bestimmt. In Abhängigkeit von der Art des Plasmids wurden die Zellen entweder mit einem Fluoreszenzmikroskop (pcDNA3-eGFP und hBD-3-pCMV6-AC-GFP) oder mit Hilfe des Luminiszenz-Lesegeräts (pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase) untersucht, oder das Zellmedium wurde für weitere ELISA-Untersuchungen gesammelt.

Im Fall von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde die Transfektionseffizienz nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen}}{\text{gesamte Zahl der Zellen}} \cdot 100 \%. \quad (3.5.1)$$

Transfektion von Zellen mit Polyfect®

Die Transfektion wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. In 100 µL Zellkulturmedium ohne Serum wurden 2 µg Plasmid-DNA zugegeben. Dazu wurden 22 µL Polyfect® gegeben, für 5 min inkubiert und zu den 800 µL Zellkulturmedium gegeben. Das Zellkulturmedium aus dem Well wurde abgesaugt, und dazu wurden 200 µL der hergestellten Suspension und 400 µL frisches Zellkulturmedium gegeben.

Transfektion mit der Standard-Calciumphosphat-Methode

10 µL 2,5 M CaCl₂-Lösung wurden mit 4 µg DNA gemischt. Nach 5 min Inkubation wurde diese Suspension mit Wasser auf 100 µL verdünnt und mit 100 µL HBS-Lösung (HEPES *buffered solution*; 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM Dextrose, 50 mM HEPES, pH 7,05) gemischt. Danach wurde 1 mL Zellkulturmedium beigelegt. Das Zellmedium im Well wurde durch 500 µL dieser Transfektionssuspension ersetzt.

Transfektion mit Lipofectamine™

Die Transfektion mit Lipofectamine™ wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. 50 µL Zellkulturmedium ohne FBS wurden mit 2 µL Lipofectamine™ gemischt und 5 min lang inkubiert. Parallel wurden 1 µg Plasmid zu den 50 µL Zellkulturmedium gegeben. Die beiden Lösungen wurden gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden 100 µL davon entnommen und mit 400 µL des Zellkulturmediums pro Well einer 24-Well Platte gegeben. Nach 7 h wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt.

Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikel und Nanostäbchen

Die Nanopartikel- bzw. Nanostäbchen-Dispersionen wurden mit dem Zellkulturmedium gemischt, und davon wurden 500 μL in jedes Well gegeben. Dazu wurde das Zellkulturmedium mit 10 % (V/V) FBS und Antibiotika benutzt, ausgenommen die Transfektions-Experimente mit hBD3-kodierender DNA (hBD-3-pCMV6-AC-GFP). Für diese Untersuchungen wurde das Zellkulturmedium ohne Antibiotika verwendet. Für die *time-lapse*-Untersuchungen wurden Calciumphosphat-Nanopartikel direkt zu den Zellmedium im Well beigefügt. Das Zellmedium wurde nach 7 h von Zellen abgenommen und mit frischem Medium ersetzt. Die verwendeten Volumina von Nanopartikel-Dispersionen und die Calciumphosphat-, DNA- und PEI-Konzentrationen pro Well sind in dem jeweiligen Kapitel in einer Tabelle zusammengefasst.

3.5.5 Luciferase-Aktivität

Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach der Transfektion mit der pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase ermittelt. Die Zellen wurden mit 200 μL der frisch hergestellten Substrat-Lösung mit Luciferin 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Substrat-Lösung enthält einen Volumenanteil Luciferin-Substrat-Puffer (0,06 g L^{-1} EDTA; 3,9 g L^{-1} MgSO_4 ; 31 g L^{-1} DTT; 21,5 g L^{-1} Tricine; 1,25 g L^{-1} Coenzym A; 0,78 g L^{-1} Luciferin; 1,76 g L^{-1} ATP; pH 7,8), einen Volumenanteil Lysis-Puffer (3 % (V/V) Triton X-100; 10 % (V/V) Glycerin; 10 % (V/V) DTT; 25 mM Na_2HPO_4 ; 25 mM Tris-HCl; pH 7,8) und vier Volumenanteile PBS. Danach wurden 150 μL der Lösung aus jedem Well entnommen und in eine schwarze 96-Well Platte übertragen. Die Lumineszenz wurde am Multiplatten-Lesegerät gemessen. Die Messdaten für die mit Polyfect® transfizierten Zellen wurden als 100 % angenommen. Die Daten der Proben wurden darauf normiert.

Die Luciferase-Aktivitäts-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Sebastian Neumann, Fakultät für Chemie und Biochemie der Ruhr-Universität Bochum, durchgeführt.

3.5.6 ELISA

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wurde für die quantitative Bestimmung der Proteine im Zellmedium nach der Transfektion benutzt. Die Durchführung entsprach der Vorschrift des Herstellers. Das Zellkulturmedium wurde gesammelt, zentrifugiert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Kalibrationskurve wurde für jeden Versuch neu bestimmen.

3.5.7 Gen-Stummschaltungs-Experimente

Die stabil transfizierte HeLa-eGFP-Zelllinie diente als Objekt für die Gen-Stummschaltungs-Versuche. Die Zellen wurden analog zu den Transfektionsexperimenten vorbereitet. Das Zellmedium wurde nach 7 h ersetzt, und die Effizienz wurde 48 h bzw. 72 h nach der Nanopartikel-Zugabe bestimmen.

Für diese Untersuchungen wurde eine zusätzliche Kontrolle mit siRNA angefertigt. Dafür wurde die Menge siRNA zu den Zellen gegeben, die der Menge siRNA im Transfektionssystem entsprach.

Die Gen-Stummschaltungs-Effizienz wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\frac{\text{Anteil der nichtfluoreszierenden Zellen in der Probe}}{\text{Anteil der fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}} - \frac{\text{Anteil der nichtfluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}}{\text{Anteil der fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}}}{\text{Anteil der fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}} \cdot 100 \% \quad (3.5.2)$$

Als Kontrolle dienten die nichttransfizierten HeLa-eGFP-Zellen.

Gen-Stummschaltung von Zellen mit Polyfect®

Für die Gen-Stummschaltung mit Polyfect® in Experimenten mit Calciumphosphat/siRNA-Nanostäbchen wurden 165 µg siRNA (Kapitel 4.3.1) oder 9,8 µg siRNA (Kapitel 4.3.2) in 100 µL Zellkulturmedium ohne Serum gelöst. Dazu wurden 22 µL Polyfect® gegeben und nach 5 min mit 800 µL Zellkulturmedium gemischt. Das Zellkulturmedium aus dem Well wurde abgesaugt, und dazu wurden 200 µL der hergestellten Suspension und 400 µL frisches Zellkulturmedium gegeben.

Gen-Stummschaltung mit Lipofectamine™

Die Gen-Stummschaltung mit Lipofectamine™ wurde nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Zu 50 µL des Zellkulturmediums ohne Serum wurde 1 µL Lipofectamine™ gegeben und nach 5-minütiger Inkubation mit 50 µL Zellkulturmedium und 20 pmol siRNA gemischt. Diese Lösung wurde für 20 min bei RT inkubiert. Zu den Zellen pro Well einer 24-Well Platte wurden 400 µL Zellkulturmedium und 100 µL der hergestellten Lösung zugegeben. Nach 7 h wurde das Medium gewechselt.

Gen-Stummschaltung von Zellen mit Calciumphosphat-Nanopartikel und Nanostäbchen

Die Nanopartikel- bzw. Nanostäbchen-Dispersionen wurden mit dem Zellkulturmedium gemischt, und davon wurden 500 µL pro Well gegeben. Für die *time-lapse*-Untersuchungen wurden Calciumphosphat-Nanopartikel direkt zu den Zellmedium im Well gegeben. Das Zellmedium wurde nach 7 h von Zellen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die verwendeten Volumina von Nanopartikel-Dispersionen und die Calciumphosphat-, siRNA- und PEI-

Konzentrationen pro Well sind in dem jeweiligen Kapitel in einer Tabelle zusammengefasst.

3.5.8 Zellvitalitätstest

Die Vitalität der Zellen nach der Transfektion oder Gen-Stummschaltung wurde mittels MTT-Analyse untersucht. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird in der Zelle von NADH und NADPH bei Glykolyse in violette, wasserunlösliches Formazan reduziert. Die Intensität der violetten Farbe von Formazan zeigt die Vitalität der Zelle.

Für die MTT-Lösung wurden 5 mg MTT in 1 mL PBS gelöst und mit 4 mL Zellkulturmedium gemischt. Das Zellkulturmedium wurde aus dem Well entfernt und durch 300 µL der MTT-Lösung ersetzt. Die Zellen wurden für 1 h im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die MTT-Lösung entnommen und mit 300 µL DMSO ersetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die DMSO aus jedem Well entnommen und in eine 96-Well Platte übertragen. Die optische Dichte wurde an einem *Multiskan FC* bei Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Messwerte der unbehandelten Zellen dienten als Kontrolle.

Die Zellvitalität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Absorption bei 570 nm für die Probe}}{\text{Absorption bei 570 nm für die Kontrolle}} \cdot 100 \% \quad (3.5.3)$$

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Nukleinsäure-funktionalisierte und Polyethylenimin-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel für Transfektion

4.1.1 Einführung in die Thematik

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen kann erfolgreich mit Hilfe von Calciumphosphat-Nanopartikeln, die als Trägersystem für Nukleinsäuren dienen, durchgeführt werden. Eine gute Biokompatibilität der Calciumphosphat-Nanopartikel ist in mehreren *in-vitro*-Untersuchungen nachgewiesen worden.^[4, 172, 182] Die einschaligen Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel bestehen aus dem Calciumphosphat-Kern und einer Schicht der Plasmid-DNA.^[174] Die zweite DNA-Schicht führte zu einer elektrostatischen Stabilisierung der Nanopartikel und zu einer höheren Effizienz der Transfektion. Das System der dreischaligen Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel wurde vollständig charakterisiert und untersucht.^[172, 174] ζ -Potenzial-Messungen haben die negative Oberflächenladung der dreischaligen Calciumphosphat-Nanopartikel bestätigt.^[174]

Die äußere Zellmembran besitzt eine negative Ladung. Die Umladung der negativ geladenen Nanopartikel in positiv geladene Nanopartikel führte daher zu einer erhöhten Aufnahme von Nanopartikeln in die Zellen.^[183-185] Diese positive Ladung der Calciumphosphat-Nanopartikel kann mittels eines positiv geladenen Polymers angebracht werden.^[183]

Das kationische Polymer Polyethylenimin (Abbildung 4.1.1) ist aufgrund seiner hohen positiven Ladung und der verzweigten Struktur besonders gut geeignet. Polyethylenimin bildet Aggregate mit DNA, die positiv geladen sind, und auf der negativ geladenen Zellmembranoberfläche akkumulieren können.^[100, 126, 134-136]

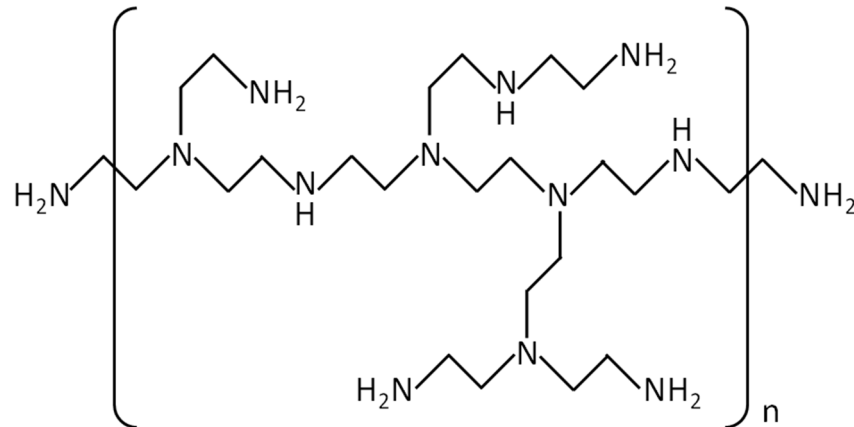


Abb. 4.1.1: Monomereinheit des verwendeten Polyethylenimins (PEI, verzweigt).

Polyethylenimin besitzt eine hohe Puffer-Kapazität und führt nach der *proton sponge*-Hypothese^[139] durch die Erhöhung des osmotischen Drucks zur Zerstörung des Endosoms. Dadurch wird der PEI/DNA-Komplex im Zytosol freigesetzt,^[126, 138] und die Nukleinsäuren werden nicht durch die lysosomale Enzyme zerstört.

Die Zugabe des positiv geladenen Polymers (PEI) anstatt von DNA zu der Nanopartikel-Dispersion führte zu einer positiven Ladung der Partikel und einer erhöhten Transfektionseffizienz.^[10]

In diesem Kapitel werden die Synthese, die Charakterisierung, die Transfektionseffizienz und die Zytotoxizität der Polyethylenimin-stabilisierten DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel beschrieben. Die schematische Darstellung der Nanopartikel ist in Abbildung 4.1.2 gezeigt.

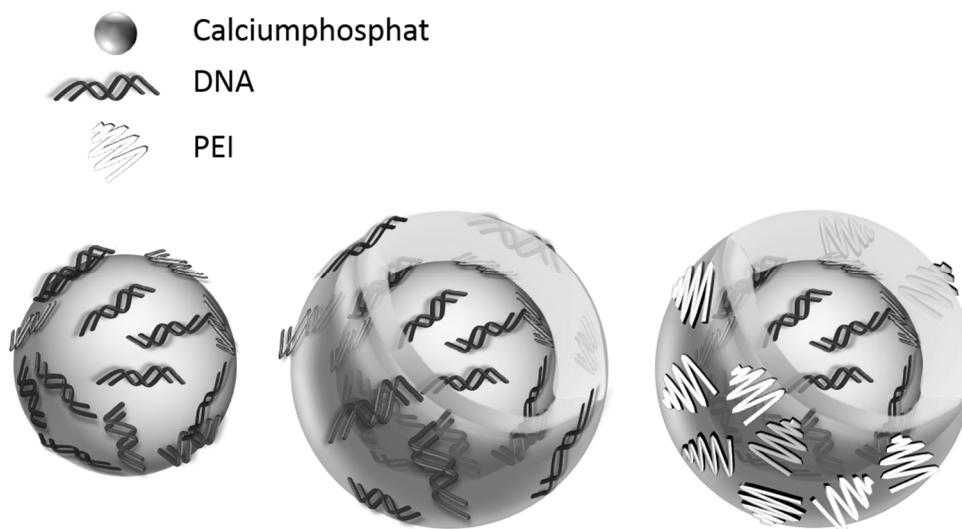


Abb. 4.1.2: Schematische Darstellung (von links nach rechts) der einschaligen Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel, der dreischaligen Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel und der DNA-funktionalisierten und PEI-stabilisierten Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel.

4.1.2 Charakterisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel

Die Synthese der DNA-funktionalisierten und PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurde wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben durchgeführt. Die dargestellten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mit pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase funktionalisiert und mit Polyethylenimin stabilisiert. Tabelle 4.1.1 enthält die Daten zur Zusammensetzung der PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Tab. 4.1.1: Zusammensetzung und kolloidchemische Charakterisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit der pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase funktionalisiert wurden.

Probe	Abkürzung	$c(\text{CaP}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{PEI}) / \text{mg mL}^{-1}$	PDI	Durchmesser (DLS) / nm	Durchmesser (REM) / nm	ζ -Potential / mV
Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel	CaP/DNA	0,27	0,17	-	0,4	249	63±17	-29±6
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/DNA	0,27	0,17	-	0,4	611	98±26	-29±4
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI (0,05)-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI(0,05)	0,28	0,09	0,05	0,4	187	nicht bestimmbar ¹	+1±4
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI (0,1)-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI(0,1)	0,28	0,09	0,09	0,4	285	92±19	+36±5
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI (0,5)-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)	0,24	0,08	0,37	0,3	152	124±29	+36±4

¹ – die Größe der Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,05)-Nanopartikel könnte in den durch REM erhaltenen Abbildungen wegen der Agglomeration nicht gemessen werden.

Ein Nachteil von Transfektionssystemen, die ein positiv geladenes Polymer enthalten, ist oft die Zelltoxizität.^[112, 186-187] Um stabile Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel zu synthetisieren, die effektiv sind und keine zelltoxische Wirkung bei der Transfektion zeigen, wurden unterschiedliche Polymer-Mengen für die Stabilisierung der Nanopartikel verwendet.

Die Größe und das Zetapotential der Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht (Tab. 4.1.1). Die Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel (CaP/DNA-Nanopartikel) besitzen eine stark negative Ladung aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Die Ergebnisse der ζ -Potential-Messungen zeigen eine Abhängigkeit des ζ -Potentials von der Polymer-Konzentration. Da eine positive Oberflächen-Ladung aus den Aminogruppen des Polymers resultiert, besitzen die Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,1)-Nanopartikel und Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,5)-Nanopartikel ein wesentlich höheres ζ -Potential (ca. +30 mV) als die Nanopartikel, die mit weniger Polymer stabilisiert wurden (+1 mV). Die mittels DLS erhaltenen Daten zeigen eine hohe Polydispersität der Nanopartikel (PDI=0,3-0,4).

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.1.3 zeigen eine sphärische Morphologie der Nanopartikel. Die durchschnittliche Größe der Nanopartikel wurde mithilfe von *ImageJ* ermittelt. Der mittlere Durchmesser der einschaligen Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel beträgt 63 ± 17 nm. Die dreischaligen Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel zeigen eine Größe von 98 ± 26 nm, die Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,1)-Nanopartikel sind 92 ± 19 nm groß, und die Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,5)-Nanopartikel sind 124 ± 29 nm groß. Somit nimmt die Größe der Calciumphosphat-Nanopartikel sowohl mit der Anzahl der Schalen als auch mit steigender PEI-Menge zu.

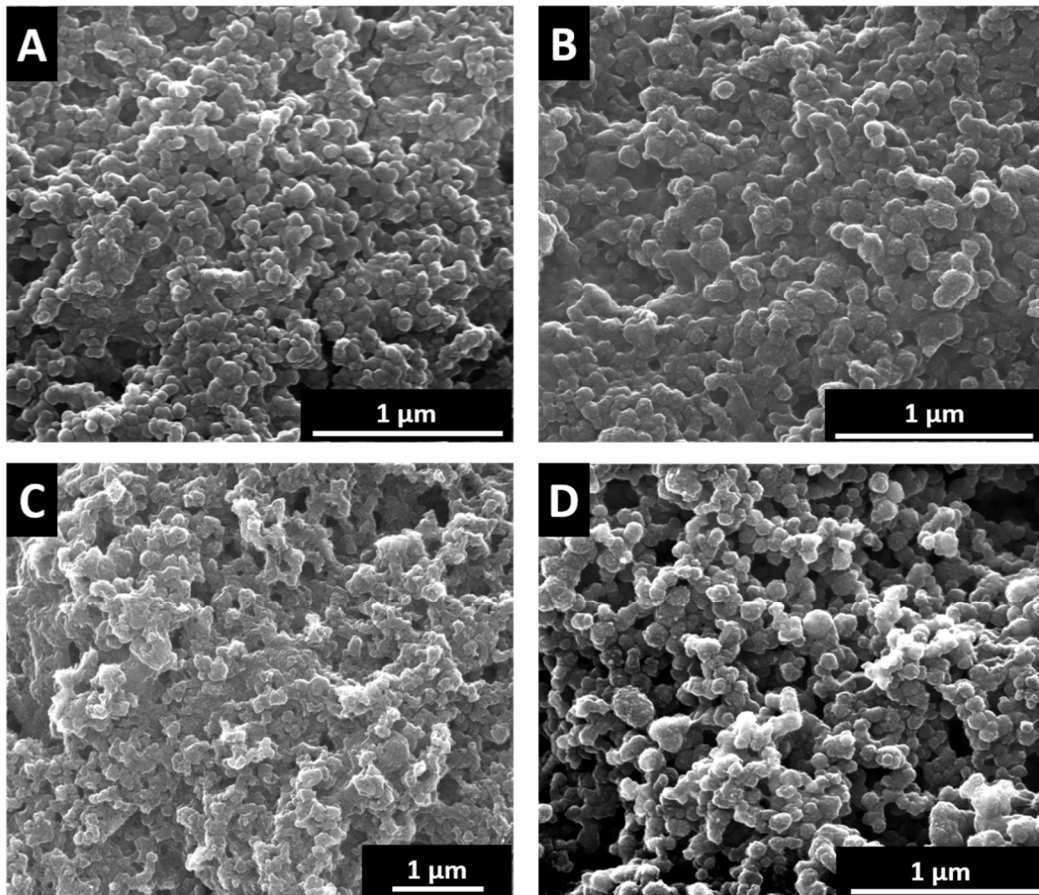


Abb. 4.1.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel und der PEI-beschichteten DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel. CaP/DNA- (A), CaP/DNA/CaP/DNA- (B), CaP/DNA/CaP/PEI(0,1)- (C) und CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)-Nanopartikel (D).

Der Unterschied zwischen den Nanopartikel-Größen, die mittels REM und DLS erhalten wurden, liegt vor allem an den Methoden. Bei dem REM finden die Messungen im Vakuum statt, sodass die Polymerhülle kollabiert und nur der Calciumphosphat-Kern sichtbar ist. Die DLS-Messungen fanden in Dispersion statt, sodass der hydrodynamische Radius der Nanopartikel bestimmt wurde.^[188]

4.1.3 Zellaufnahme, Transfektionseffizienz und Zytotoxizitätstests

Die Zellaufnahme-Untersuchungen wurden an HeLa-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die HeLa-Zellen zusammen mit den pcDNA3-eGFP-funktionalisierten und PEI-FITC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln (Calciumphosphat/pcDNA3-eGFP/Calciumphosphat/PEI-FITC(0,5)) für 5 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert.

Abbildung 4.1.4 zeigt die Aufnahme der Nanopartikel durch HeLa-Zellen.

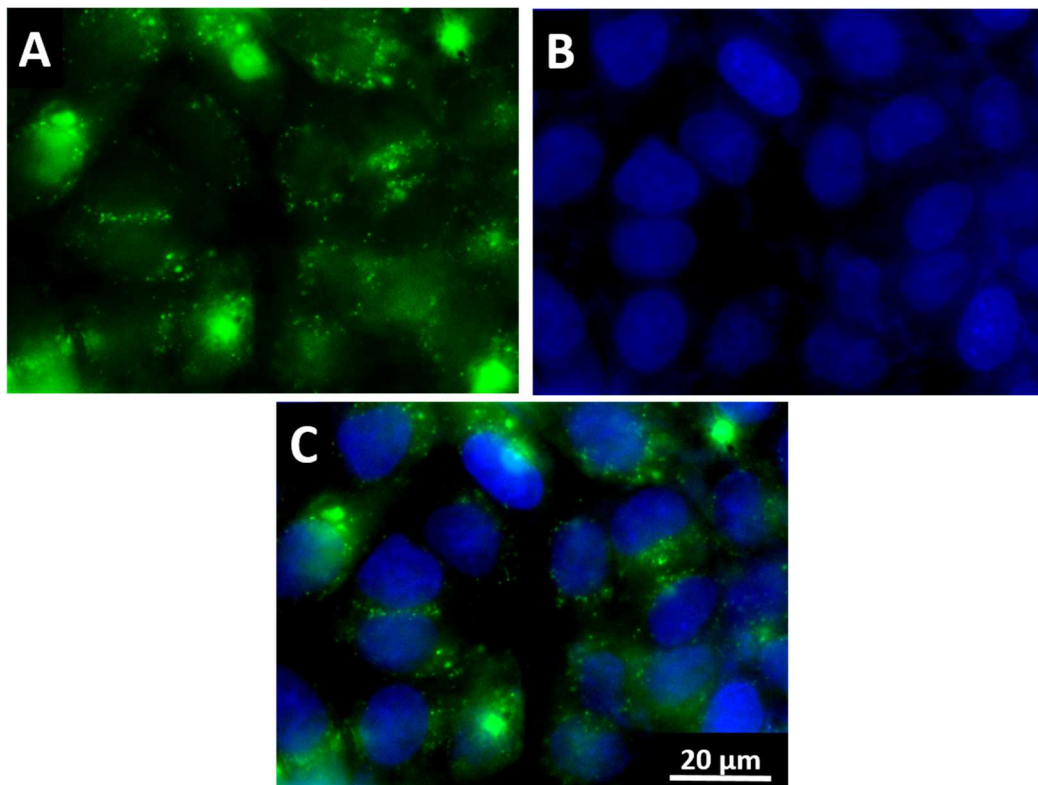


Abb. 4.1.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 5-stündiger Inkubation mit (A) PEI-FITC funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln (grün); (B) die Zellkerne wurden mittels DAPI blau angefärbt; (C) Überlagerung von (A) und (B).

Die Zellaufnahme-Studien von ähnlichen Calciumphosphat-Nanopartikeln wurden von Sokolova *et al.* an HeLa-Zellen durchgeführt.^[6] Die PEI-stabilisierten

Calciumphosphat-Nanopartikel gingen gut durch die Zellmembran. Die Nanopartikel konnten bereits nach 3 h in Lysosomen nachgewiesen werden.^[6, 189] Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in Abb. 4.1.4 zeigen, dass sich die DNA-funktionalisierten und PEI-FITC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach 5 h im Zytosol befinden. Das stimmt mit den Ergebnissen von Sokolova *et al.* überein.

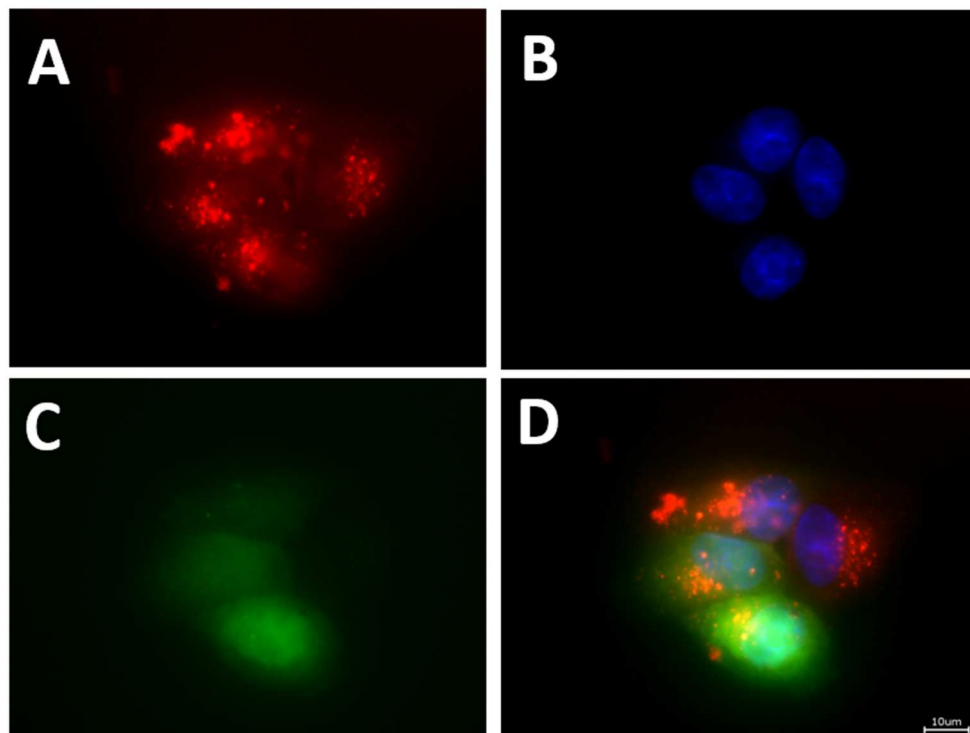


Abb. 4.1.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit PEI-TRITC funktionalisierten pcDNA3-eGFP-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln. TRITC (rot) (A); DAPI-markierte Zellkerne (blau) (B); eGFP (grün) (C); Überlagerung von A, B, C (D).

Nach 24 h Inkubation der HeLa-Zellen mit PEI-TRITC-stabilisierten und pcDNA3-eGFP-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln konnte neben dem grün-fluoreszierenden eGFP auch die rote Fluoreszenz des TRITC innerhalb der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.1.5).

Die Transfektionseffizienz der pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel und der PEI-funktionalisierten

Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel wurde an HeLa-Zellen untersucht. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem kommerziell erhältlichen Reagenz Polyfect® und nach der Standard-Calciumphosphat-Methode mit pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase transfiziert.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde die katalytische Aktivität der Luciferase gemessen und für alle Systeme auf die Messwerte der Polyfect®-transfizierten Zellen (100 %) normiert. 48 h nach der Transfektion wurde ein Substrat (Luziferin) für Luciferase zu den transfizierten Zellen gegeben. Die dabei entstandene Lumineszenz konnte mit einem Luminometer quantifiziert werden. Es wurde die Menge an zugegebenen Calciumphosphat-Nanopartikeln variiert, um eine konzentrationsabhängige Effektivität der Calciumphosphat-Nanopartikel zu untersuchen. Die Konzentrationen der Calciumphosphat-Nanopartikel, an DNA und PEI im Zellmedium bei den Transfektionsuntersuchungen sind in Tabelle 4.1.2 zusammengefasst.

Tab. 4.1.2: Zusammensetzungen der Calciumphosphat-, DNA-, PEI-Konzentrationen und die gesamte Partikelkonzentration pro mL Zellkulturmedium im Well nach Zugabe der pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zu den Zellen für die Transfektion.

Probe	Abkürzung	Probe pro Well / μL	$c(\text{CaP}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{PEI}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{NP}) \cdot 10^{10} / \text{mL}^{-1}$ Zellmedium
Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel	CaP/DNA	10	5,3	3,4	0	1,3
		19	10,3	6,6	0	2,5
		37	19,9	12,7	0	4,9
		69	37,1	23,6	0	9,1
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/DNA	10	5,3	3,4	0	0,3
		19	10,3	6,6	0	0,7
		37	19,9	12,7	0	1,3
		69	37,1	23,6	0	2,4
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,05)-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI(0,05)	10	5,5	1,8	0,9	-
		19	10,9	3,5	1,7	-
		37	20,9	6,7	3,3	-
		69	38,9	12,4	6,2	-
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,1)-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI(0,1)	10	5,4	1,7	1,7	0,4
		19	10,6	3,4	3,4	0,8
		37	20,5	6,5	6,5	1,6
		69	38,2	12,2	12,2	3,0

Tab. 4.1.2: Zusammensetzungen der Calciumphosphat-, DNA-, PEI-Konzentrationen und die gesamte Partikelkonzentration pro mL Zellkulturmedium im Well nach Zugabe der pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zu den Zellen für die Transfektion.

Probe	Abkürzung	Probe pro Well / μL	$c(\text{CaP}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{PEI}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{NP}) \cdot 10^{10} / \text{mL}^{-1}$ Zellmedium
Calciumphosphat/DNA/ Calciumphosphat/PEI(0,5)- Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/ PEI(0,5)	10	4,6	1,5	7,4	0,2
		19	9,1	2,9	14,4	0,3
		37	17,4	5,6	27,8	0,6
		69	32,1	10,3	51,7	1,1
Polyplexe aus DNA/PEI(0,1)	DNA/PEI(0,1)	10	0	1,7	1,7	-
		19	0	3,4	3,4	-
		37	0	6,5	6,5	-
		69	0	12,2	12,2	-
Polyplexe aus DNA/PEI(0,5)	DNA/PEI(0,5)	10	0	1,5	7,4	-
		19	0	2,9	14,4	-
		37	0	5,6	27,8	-
		69	0	10,3	51,7	-

Die Ergebnisse der Transfektion sind in Abbildung 4.1.6 dargestellt.

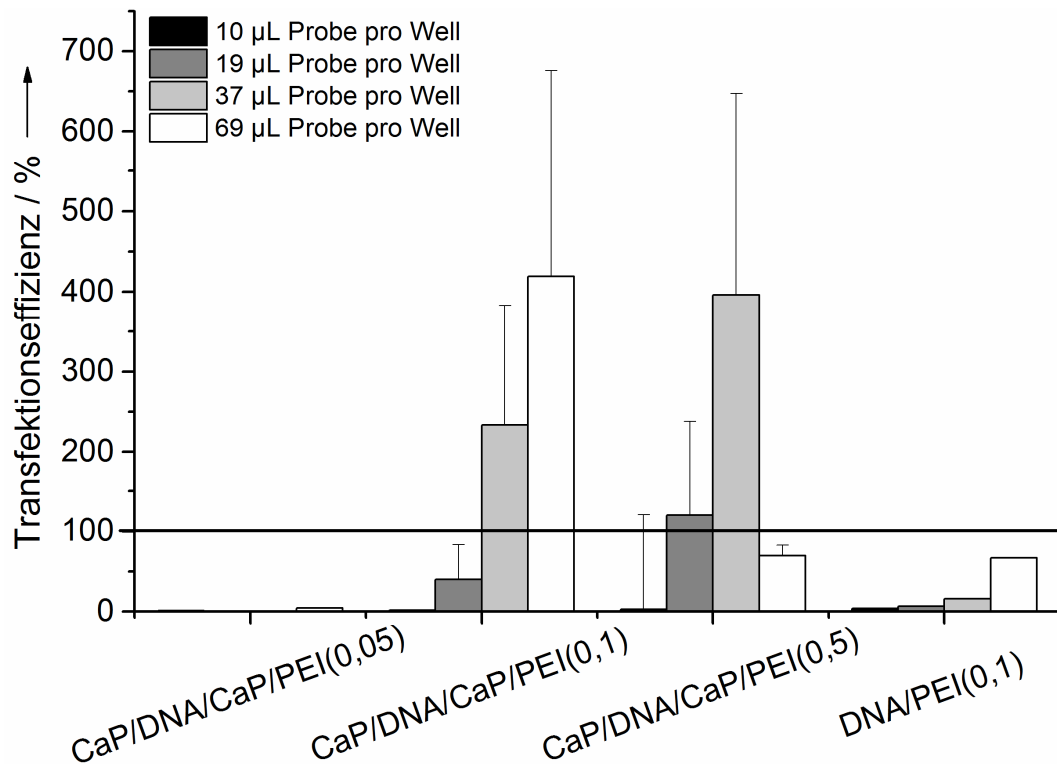


Abb. 4.1.6: Luciferase-Aktivität von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit CaP/DNA/CaP/PEI(0,05)-, CaP/DNA/CaP/PEI(0,1)-, CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)-Nanopartikeln, sowie mit Kontrolle-Polplexen DNA/PEI(0,1) und mit Polyfect®. Die Luciferase-Aktivität mit Polyfect®-transfizierte Zellen ist auf 100 % normiert.

Die negativ geladenen pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase-funktionalisierten Calciumphosphat/DNA- und Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel zeigten eine geringe Transfektionseffizienz, die nicht mehr als 1 % der Effizienz von Polyfect® betrug (nicht dargestellt). Diese Ergebnisse sind mit den Transfektionen nach der Standard-Calciumphosphat-Methode von Graham und van der Eb vergleichbar.^[110] Die negativ geladenen pcDNA3-eGFP-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel von Welzel *et al.*^[190] zeigten ähnliche Effizienzen. Der Unterschied in den Transfektionseffizienzen von Polyfect® und Nanopartikel kann mit Unterschieden in den intrazellulären Mechanismen erklärt werden. Bei der Transfektion von Zellen mit Polyfect® wird

die DNA vor lysosomalen Enzymen geschützt. Nach Angabe des Herstellers beeinflusst Polyfect® den pH-Wert in Endosomen, sodass die Enzyme inhibiert werden und die DNA-Polyfect® Komplexe stabil sind. Nach der endozytotischen Aufnahme von Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln in die Zelle befinden sich die Nanopartikeln in den Endosomen.^[6, 191] Die an die Calciumphosphate gebundene DNA wird mit hoher Wahrscheinlichkeit von lysosomalen Enzymen zerstört. Polyethylenimin wurde auf die Oberfläche der Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat-Nanopartikel adsorbiert, sodass das Zetapotential des Systems positiv wurde. Durch die positive Oberflächenladung werden diese Nanopartikel gut von den Zellen aufgenommen, und durch das PEI wurde dieses Plasmid vor Degradation durch lysomale Enzyme geschützt.^[126, 142] Da das PEI über die „*proton sponge*“-Eigenschaften verfügt, wird es protoniert, was die Erniedrigung des pH-Werts des Endosoms verhindert. Die Ionen-Konzentration wächst und Wasser diffundiert in Endosom. Infolgedessen wird der osmotische Druck höher, was zu Zerstörung des Endosoms und zur Freisetzung der Nukleinsäure-Polymer-Komplexe in das Zytosol führt.^[126, 138]

Die PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten eine hohe Transfektionseffizienz im Vergleich zu den anderen Systemen (Polyplexe, Calciumphosphat-Nanopartikel ohne PEI, Standard-Calciumphosphat-Methode (S) und Polyfect®). Bei ähnlichen oder niedrigen DNA-Konzentrationen besitzen die PEI-funktionalisierten Nanopartikel eine höhere Effizienz als die negativ geladenen Calciumphosphat-Nanopartikel.

Es wurden unterschiedliche Mengen der Partikel an den Zellen getestet, um die optimale Korrelation zwischen Effizienz und Toxizität des Systems zu finden. Die Ergebnisse bestätigten eine Abhängigkeit zwischen der Menge an PEI, die zu den Zellen gegeben wurde, der Zellvitalität und der Transfektionseffizienz. Das System mit der höchsten Transfektionseffizienz waren die Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,1)-Nanopartikel.

Für diese Nanopartikel wurde keine Zelltoxizität im MTT-Test nachgewiesen (Abb. 4.1.7).

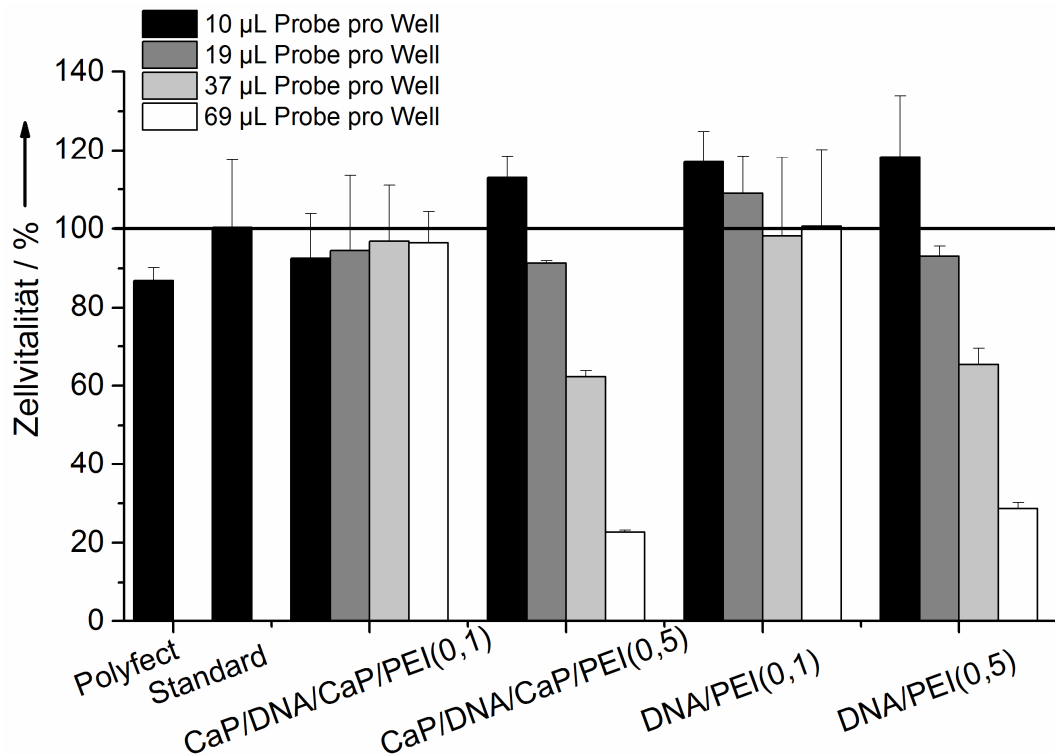


Abb. 4.1.7: Vitalität von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit CaP/DNA/CaP/PEI(0,1)-, CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)-Nanopartikel sowie mit Kontroll-Polplexen DNA/PEI(0,1) und DNA/PEI(0,5), nach der Standard-Calciumphosphat-Methode und mit Polyfect®. Die Vitalität der nichttransfizierten Zellen ist auf 100 % normiert.

Die Zugabe der Calciumphosphat-Nanopartikel mit einer höheren PEI-Konzentration (CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)-Nanopartikel) zu den Zellen führte zu einer sehr hohen Transfektionseffizienz von etwa 400 %. Allerdings lag die Zellvitalität aufgrund der hohen PEI-Konzentration lediglich bei 60 %. Eine Verdopplung der Konzentration dieser Nanopartikel im Zellmedium führte zu keiner besseren Effizienz (etwa 80 %) und zur einen sehr niedrigen Vitalität der Zellen (20 %). Die Kontrollen bestanden aus pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase und PEI in den Mengen, die den Anteilen dieser Stoffe in den Kolloiden

entsprach. Die Ergebnisse zeigen, dass die Polyplexe eine untergeordnete Rolle in der Transfektionseffizienz spielen (die maximale Effizienz lag bei 70 %).

4.1.4 Kotransfektion von zwei Plasmiden

Für die Kotransfektion von zwei Plasmiden wurden pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase und pcDNA3-eGFP in gleichen Massenanteilen gemischt und für die Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel nach dem beschriebenen Schema eingesetzt (Kapitel 3.2.1). Die Calciumphosphat-Nanopartikel mit zwei DNA-Arten wurden mittels REM analysiert. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Nanopartikel mit einer kugelförmigen Morphologie und einem Durchmesser von 60 bis 120 nm (Abb. 4.1.8).

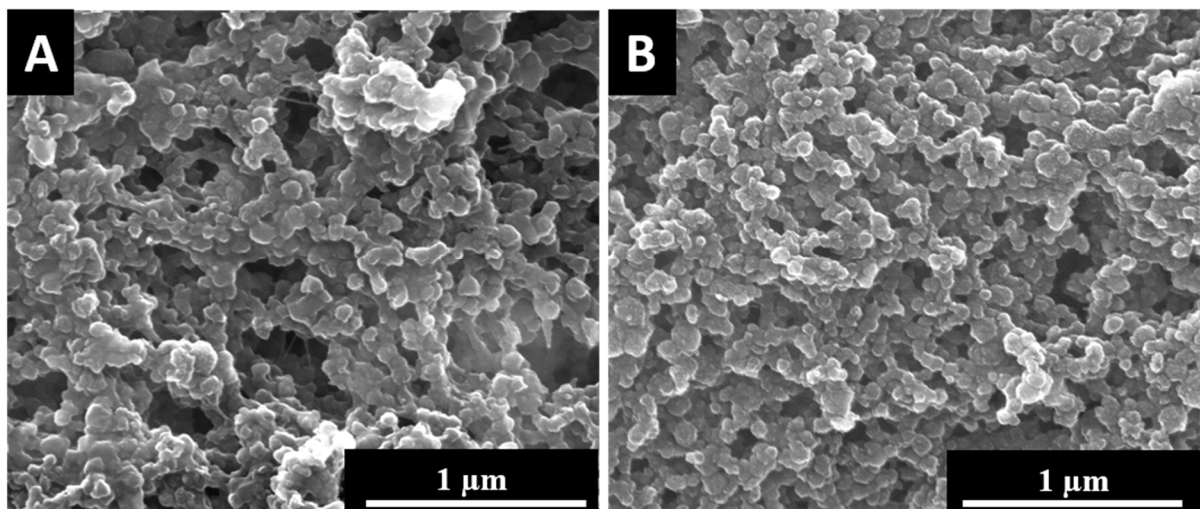


Abb. 4.1.8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Polyethylenimin-beschichteten Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase und pcDNA3-eGFP funktionalisiert wurden; (A) CaP/DNA/CaP/PEI(0,1)- und (B) CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)-Nanopartikel.

Die Transfektionsfähigkeit von beiden Reportersystemen wurde an HeLa-Zellen untersucht.

Abbildung 4.1.9 zeigt grün fluoreszierende Zellen, die bestätigen, dass die Transfektion der Zellen mit pcDNA3-eGFP-funktionalisierten Calciumphosphat-

Nanopartikel erfolgreich war. Die katalytische Aktivität der Luciferase wurde gemessen. Als Kontrolle dienten die Polyfect®-transfizierten Zellen, die auf eine Effizienz von 100 % normiert wurden.

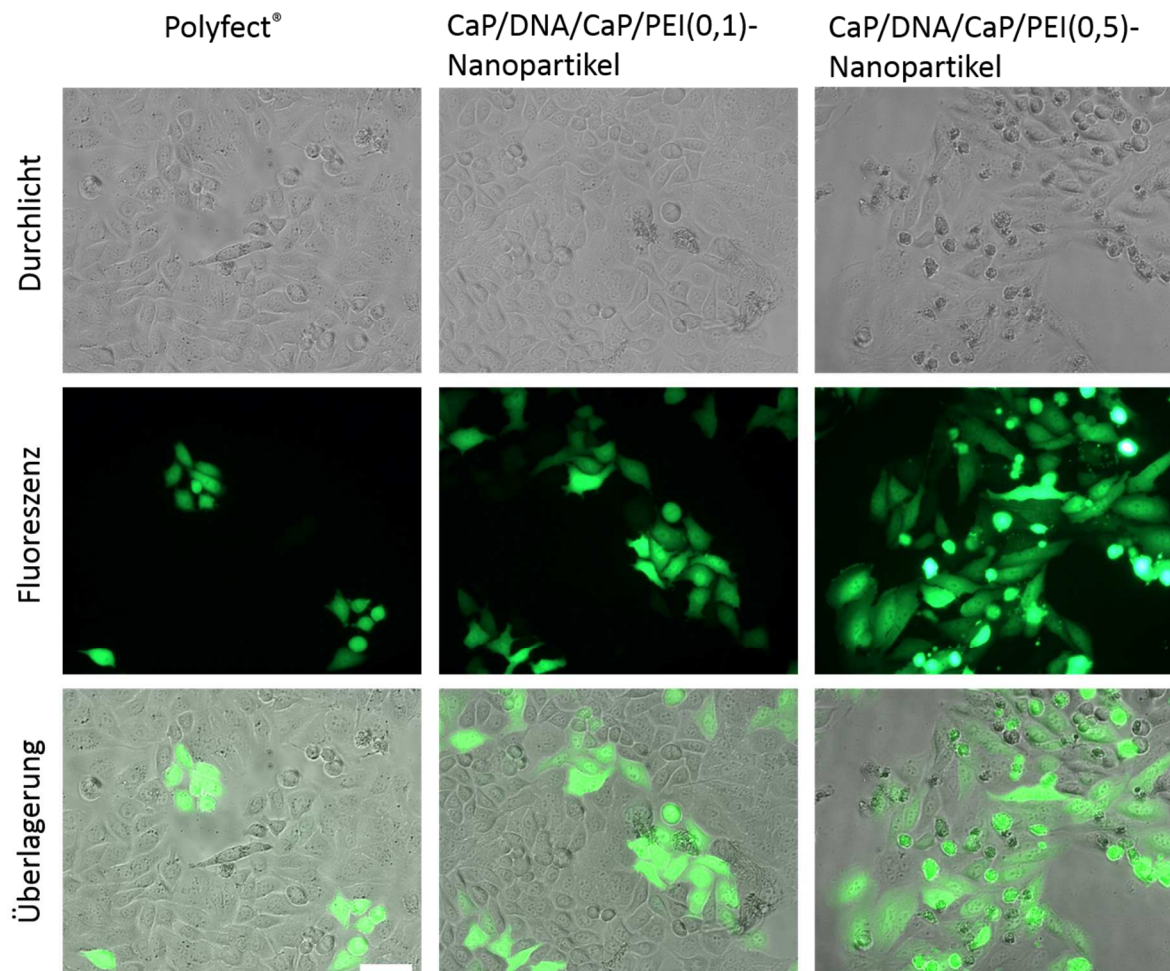


Abb. 4.1.9: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase und pcDNA3-eGFP-funktionalisierten CaP/DNA/CaP/PEI(0,1)- und CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)-Nanopartikeln sowie mit Polyfect®. Die Skala entspricht 50 µm.

In Abbildung 4.1.10 sind die Transfektionseffizienzen von beiden Reportersystemen dargestellt.

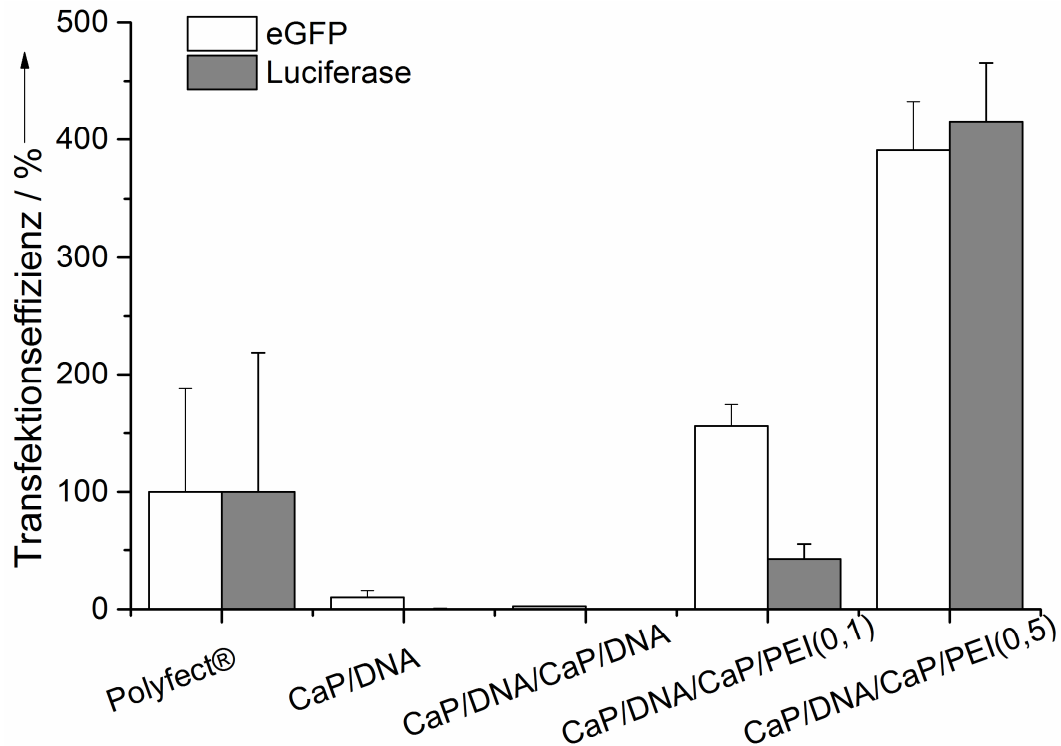


Abb. 4.1.10: Transfektionseffizienz von HeLa-Zellen nach der Kotransfektion mit CaP/DNA-, CaP/DNA/CaP/DNA-, CaP/DNA/CaP/PEI(0,1)-, CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)-Nanopartikeln und Polyfect®. Luciferase-Aktivität und eGFP-Effizienz sind für Polyfect®-transfizierte Zellen auf 100 % normiert.

Die quantitativen Auswertungen der Ergebnisse zeigten, dass bei beiden Systemen ähnliche Tendenzen beobachten werden können. Die Zugabe von PEI zu der äußeren Schale der Nanopartikel führte zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz im Vergleich zu anderen Systemen. Die Calciumphosphat-Nanopartikel mit einer höheren PEI-Konzentration wiesen eine bessere Transfektionseffizienz mit beiden Arten der DNA auf.

4.1.5 Zusammenfassung

Es wurden positiv geladene DNA-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel synthetisiert und mit HeLa-Zellen transfiziert. Eine hohe Transfektionseffizienz wurde für positiv geladene PEI-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel im Vergleich zu negativ geladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln als auch im Vergleich zur Kontrolle Polyfect® gefunden. Die Effizienz der Transfektion und die Zellvitalität zeigten eine Abhängigkeit von der PEI-Menge in den Partikeln. Eine optimale Korrelation zwischen Effizienz und Toxizität zeigten die Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,1)-Nanopartikel. Die Transfektion durch ebenfalls vorhandene DNA/PEI-Polyplexe kann nicht ausgeschlossen werden. Gemäß der Kontroll-Untersuchungen ist der Einfluss der Polyplexe jedoch gering. Die Kotransfektion von den zwei Plasmid-DNA-Arten (pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase und pcDNA3-eGFP) bestätigte eine gute Effizienz von Polyethylenimin-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

4.2 *In-situ*-Untersuchungen der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln durch *time-lapse* Mikroskopie

4.2.1 Einführung in die Thematik

Die Effizienz von nichtviralen Transfektionsmethoden wie kationischen Liposomen und kationischen Polymeren ist bekannt. Mehrere Untersuchungen wurden bereits durchgeführt, um die Kinetik der Transfektion und der Gen-Stummschaltung, sowie die Gen-Expression der eingebrachten Nukleinsäuren in der Zelle, die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik zu klären.^[114, 143, 192-198] Die *time-lapse* Mikroskopie ermöglicht die *in-situ*-Beobachtung der Zellen während der Transfektion und führt zum besseren Verständnis der Mechanismen von Nukleinsäuretransport und der Wechselwirkung mit den intrazellulären Komponenten.^[85, 197, 199-202]

In diesem Kapitel werden die Untersuchungen der zeitabhängigen Änderungen in der Protein-Expression während der Transfektion von Zellen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln beschrieben. Es wurden zwei unterschiedliche Transfektionssysteme untersucht. Eines stellen die Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel dar. Für die Gen-Stummschaltungs-Experimente wurden Calciumphosphat/siRNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel verwendet. Als Vergleich und positive Kontrolle wurde das kommerzielle Reagenz Lipofectamine™ verwendet. Die Transfektion mit Lipofectamine™ ist sehr effektiv, allerdings ist es zytotoxisch.^[96, 203] Die mit DNA oder mit siRNA funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mit Polyethylenimin beladen und von vorhandene Polyplexen mittels Zentrifugation gereinigt.

4.2.2 Charakterisierung der aufgereinigten Calciumphosphat/DNA (siRNA)/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel

Die in Kapitel 4.1. beschriebenen Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/ PEI-Nanopartikel enthalten das Polymer PEI, welches zu einer höheren Stabilität und besseren Effektivität der Calciumphosphat-Nanopartikel führte. Diese Mengen an PEI könnten aber auch eine höhere toxische Wirkung der Nanopartikel verursachen.

Um die DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit PEI in der äußeren Schale von freien DNA/PEI-Polyplexen und überschüssigem PEI abzutrennen, wurden die Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel durch Zentrifugation aufgereinigt. Die wasserlöslichen DNA/PEI-Komplexe bleiben bei der Zentrifugation im Überstand. Die Calciumphosphat-Nanopartikel mit elektrostatisch gebundener DNA und PEI sammeln sich im Niederschlag an. Dieser Niederschlag ist schlecht im Wasser redispergierbar. Eine Anwendung von Ultraschall zur Dispergieren der Calciumphosphat-Nanopartikel könnte jedoch zu einer Beschädigung der Plasmid-DNA führen.^[204] Deshalb wurden die Nanopartikel für möglichst kurze Zeit (10 s) mit dem Ultraschallfinger bearbeitet.^[205] Die Herstellung und Aufreinigung von Calciumphosphat/DNA(siRNA)/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel wurden in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

Die Zusammensetzung und die kolloidchemische Charakterisierung der aufgereinigten Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI- und Calciumphosphat/siRNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel sind in Tabelle 4.2.1 dargestellt.

Tab. 4.2.1: Zusammensetzung und kolloidchemische Charakterisierung der aufgereinigten Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI- und der aufgereinigten Calciumphosphat/siRNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel.

Probe	Abkürzung	$c(\text{CaP}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{DNA/siRNA}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{PEI}) / \text{mg mL}^{-1}$	PDI	Größe (DLS) / nm	Größe (REM) / nm	Größe (NTA) / nm	ζ -Potential / mV
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI	0,23	0,02	0,03	0,4	547	58±31	157±80	+19±6
Calciumphosphat/siRNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel	CaP/siRNA/CaP/PEI	0,12	0,02	0,01	0,3	209	66±20	230±120	+22±5

Abbildung 4.2.1 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der aufgereinigten Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel (A), und der aufgereinigten Calciumphosphat/siRNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel (B). Diese Calciumphosphat-Nanopartikel besitzen eine sphärische Morphologie, und der Durchmesser der Partikel beträgt etwa 60 nm (Tabelle 4.2.1).

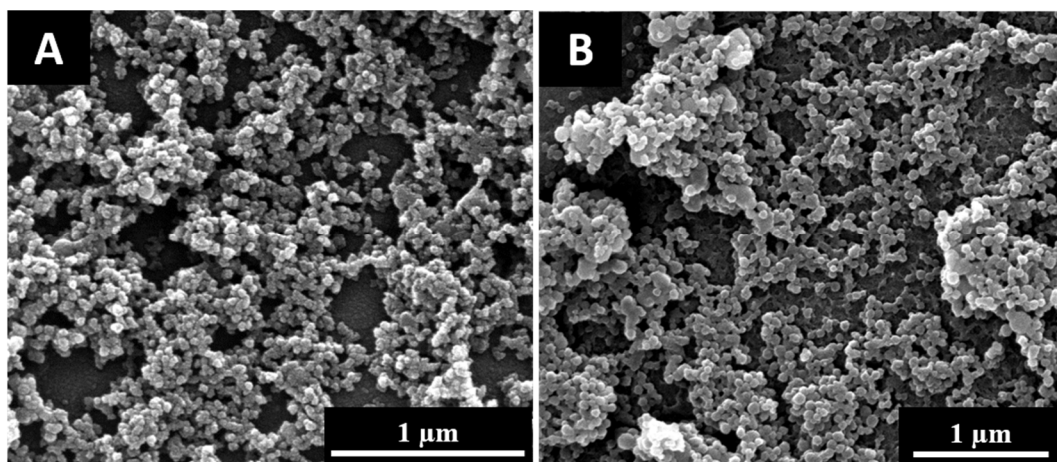


Abb. 4.2.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der aufgereinigten CaP/DNA/CaP/PEI-Nanopartikel (A) und der aufgereinigten CaP/siRNA/CaP/PEI-Nanopartikel (B).

Die Calciumphosphat-Konzentration wurde durch die mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmte Calcium-Konzentration berechnet (Kapitel 3.3). Die PEI-Konzentration an den Nanopartikeln wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt. Dafür wurde zur Synthese der Nanopartikel FITC-markiertes PEI verwendet. Die Zetapotential-Messungen der aufgereinigten Calciumphosphat-Nanopartikel ergaben eine positive Ladung (+20 mV), die geringer im Vergleich zu den nicht aufgereinigten Nanopartikeln (+36 mV) ist. Die mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmte Menge an PEI zeigt, dass nur $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ (CaP/DNA/CaP/PEI-Nanopartikel) bzw. $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ (CaP/siRNA/CaP/PEI-Nanopartikel) Polyethylenimin nach der Aufreinigung an den Partikeln bleibt. Das entspricht ca. 1 % der Anfangsmenge des Polymers. Das

überschüssige Polymer ließ sich mittels Zentrifugation gut von den Calciumphosphat-Nanopartikeln abtrennen. Die Nukleinsäure-Konzentrationen in den Dispersionen wurden mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt. Für die DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die Dispersion nach Zugabe von DNA zum Calciumphosphat-Kern nach den beschriebenen Bedingungen zentrifugiert, und die Absorption des Niederschlags und des Überstands wurden gemessen. Für die Bestimmung der siRNA-Konzentration wurden die Nanopartikel mit der AF-555-markierten siRNA funktionalisiert. Das ermöglichte die Messungen bei einer Wellenlänge von 555 nm. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.2.1 dargestellt. Abbildung 4.2.2 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellaufnahme-Untersuchungen.

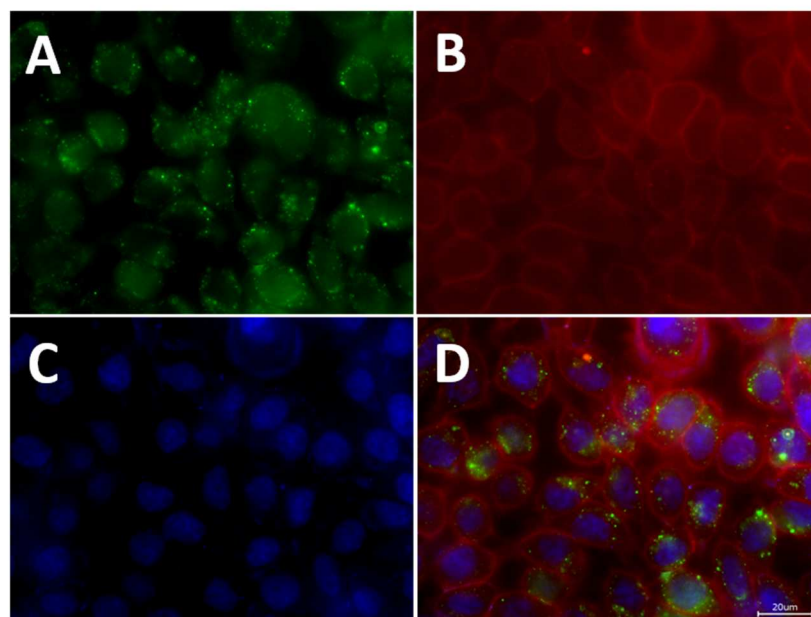


Abb. 4.2.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit aufgereinigten CaP/DNA/CaP/PEI-FITC-Nanopartikeln. **A)** PEI-FITC-markierten CaP/DNA/CaP/PEI-Nanopartikel (grün), **B)** *CellMask* eingefärbte Zellmembran (rot), **C)** DAPI-markierte Zellkerne (blau), und **D)** Überlagerung.

Für die Zellaufnahme-Untersuchungen wurden die pcDNA3-eGFP-funktionalisierten und die PEI-FITC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel

eingesetzt. Die Versuche wurden an HeLa-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden in Anwesenheit der Nanopartikel 4 h lang inkubiert, danach mit PBS gewaschen, fixiert und eingefärbt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Calciumphosphat-Nanopartikel durch die Zellmembran gehen und sich nach 4 h Inkubation innerhalb der Zellen befinden.

4.2.3 *In-situ*-Untersuchungen der Transfektion

Um die Transfektionseffizienz *in situ* zu bestimmen, wurden die aufgereinigten Calciumphosphat-Nanopartikel zu den HeLa-Zellen gegeben. Die Nanopartikel-, Calciumphosphat-, DNA- und PEI-Konzentrationen im Zellmedium nach Zugabe der Nanopartikel sind in Tabelle 4.2.2 aufgelistet. Die Transfektion mit Lipofectamine™ wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die DNA-Konzentration lag pro Well für die Transfektion mit Lipofectamine™ bei $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tab. 4.2.2: Calciumphosphat-, DNA-, PEI-Konzentrationen und gesamte Partikelkonzentration pro mL Zellkulturmedium nach Zugabe der Calciumphosphat-Nanopartikel zu den Zellen für die Transfektion.

Probe	Probe pro Well / μL	$c(\text{CaP}) /$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) /$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{PEI}) /$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{NP}) \cdot 10^{10} /$ mL^{-1} Zellmedium
Calciumphosphat/DNA/ Calciumphosphat/PEI- Nanopartikel	80	32	2,3	2,2	9

Die 72-stündige *in-situ*-Mikroskopie wurde unter Zellkulturbedingungen mithilfe der Inkubationskammer INUG2EF-KI4 (Tokay hit) mit einem BZ-9000-Mikroskop (Keyence) durchgeführt. Je zwei Bilder (licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme) wurden jede Stunde von der gleichen

Stelle automatisch aufgenommen. Die Transfektionseffizienz wurde als Zahl der grünen Zellen geteilt durch die Gesamtzahl der Zellen in Prozent berechnet.

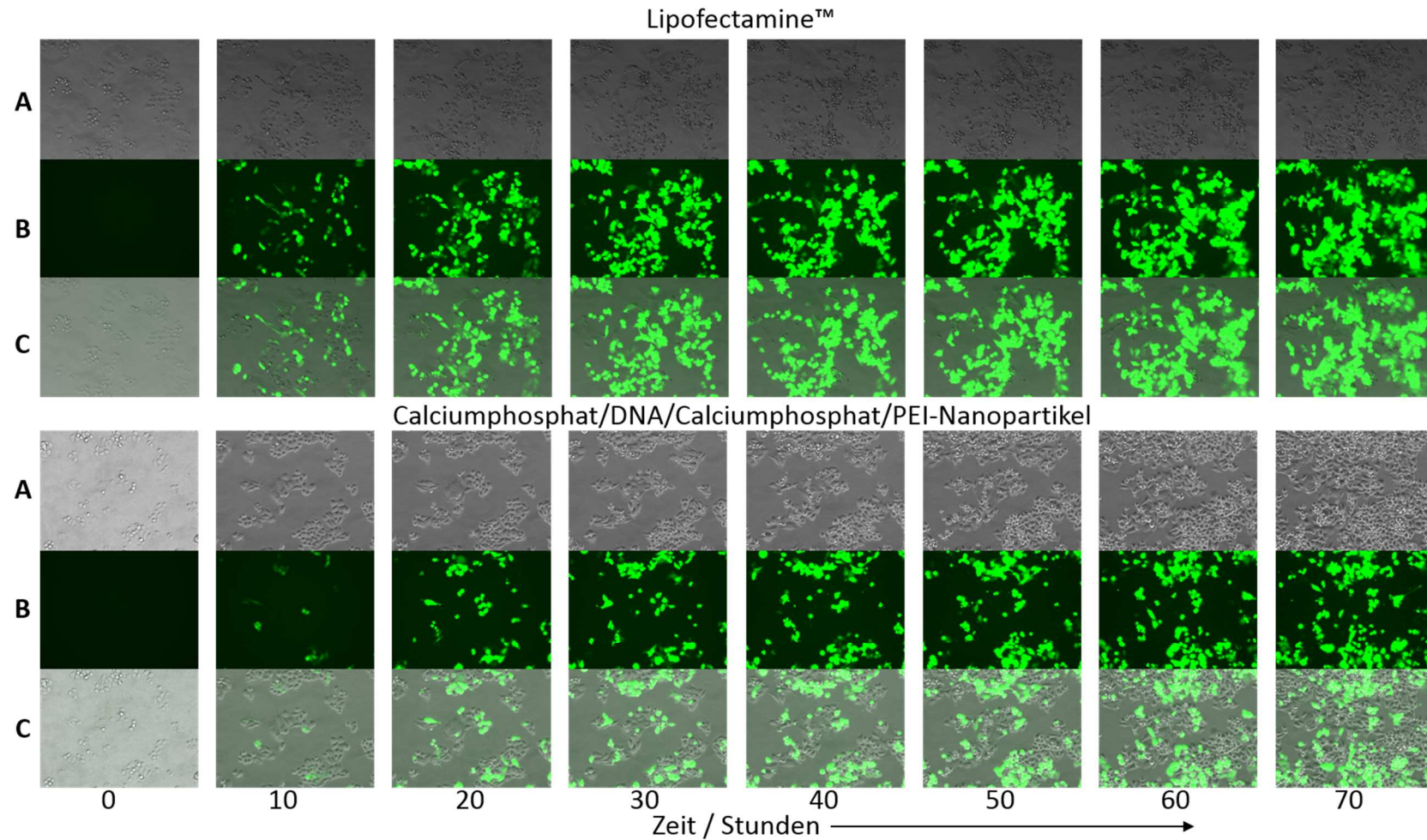


Abb. 4.2.3: Lichtmikroskopische (A) sowie fluoreszenzmikroskopische (B) Aufnahmen der HeLa-Zellen während der 72-stündigen Transfektion mit DNA-eGFP-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln sowie mit Lipofectamine™. Überlagerung von licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (C).

Abbildung 4.2.3 zeigt die lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen für jede zehnte Stunde der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln und Lipofectamine™.

Die quantitative Auswertung der Daten der *time-lapse* Mikroskopie erfolgte mittels eines Diagramms, in dem die Transfektionseffizienz gegen die Zeit aufgetragen ist (Abb. 4.2.4).

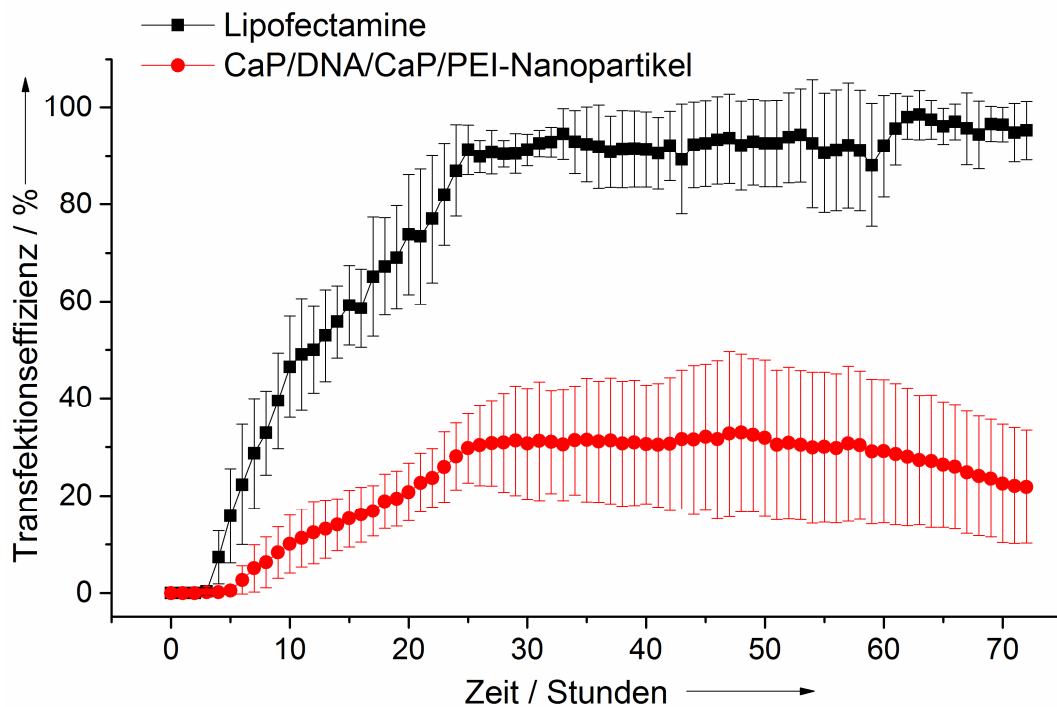


Abb. 4.2.4: Transfektionseffizienz der CaP/DNA/CaP/PEI-Nanopartikel an HeLa-Zellen während der 72-stündigen Transfektion (N=4). Als Positivkontrolle diente Lipofectamine™.

Die Transfektionseffizienzberechnungen wurden in Kapitel 3.5.4 beschrieben. Die erste grüne Fluoreszenz wurde bei 1 % der Zellen 5 h nach Partikelzugabe gefunden. Im Fall des Lipofectamins™ ergab die Transfektion ca. 7 % Effizienz bereits nach 4 h. Nach etwa 25 h erreichte die Transfektionseffizienz der Nanopartikel ihr Maximum bei 30 ± 7 % und blieb auf diesem Niveau bis zum Ende der Untersuchung. Die mit Lipofectamine™ transfizierten Zellen zeigten ein Maximum nach ebenfalls 25 h (91 ± 5 %) und behielten dieses Niveau bis zum

Ende der Beobachtung. Die Gesamtzahl an Zellen während der Transfektion wurde manuell analysiert (Abbildung 4.2.5).

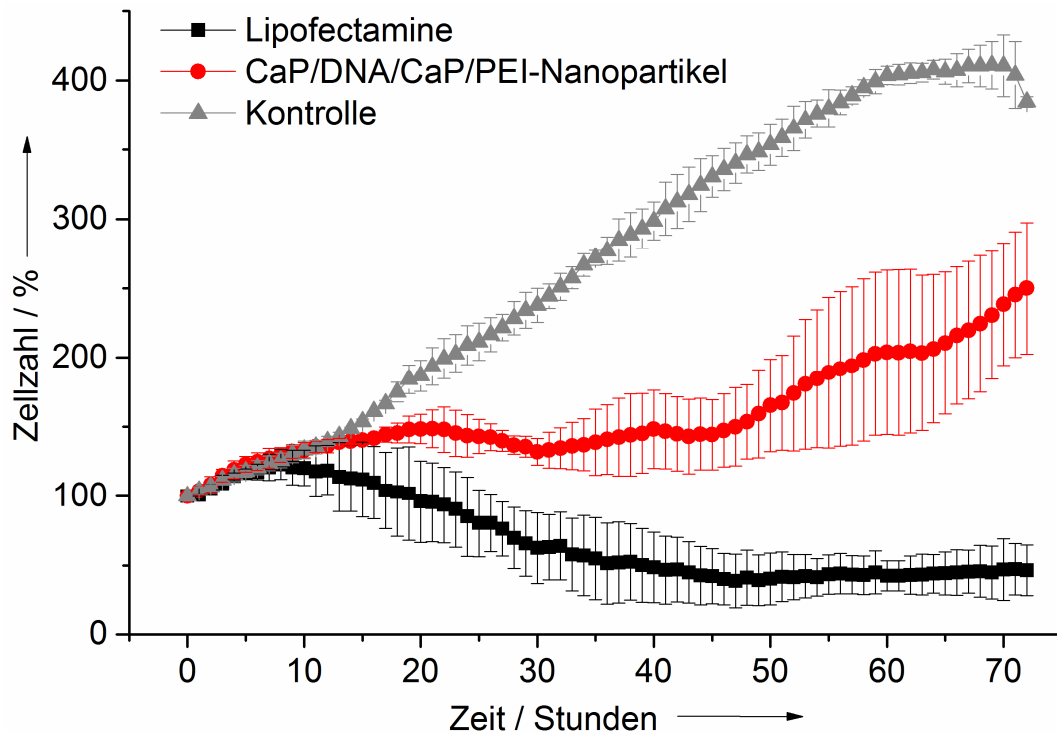


Abb. 4.2.5: Zahl der HeLa-Zellen (als 100 % diente die Gesamtzellzahl bei der ersten Aufnahme (0 h)) während einer 72-stündigen Transfektion mit CaP/DNA/CaP/PEI-Nanopartikeln sowie während der Transfektion mit Lipofectamine™ (N=4). Als Kontrolle dienten unbehandelte HeLa-Zellen.

Die Zellzahl ist die Gesamtzahl an HeLa-Zellen pro Aufnahme, die keine morphologischen Veränderungen und eine zelltypische Morphologie zeigen. Die Beobachtung der Zellen in Dynamik ermöglichte eine klare Unterscheidung von sterbenden bzw. bereits gestorbenen Zellen von den lebendigen und den durch Teilung abgerundeten Zellen. Die Kontrolle HeLa-Zellen zeigten eine Erhöhung der Zellzahl auf 300 % nach 72 h. Die mit Lipofectamine™ transfizierten Zellen zeigten mit der Zeit eine Erniedrigung der Zellzahl im Vergleich zu der Zellzahl vor der Zugabe des Transfektionsreagenzes. Wie erwartet zeigte Lipofectamine™ keine Erhöhung der Zellzahl, was auf eine zytotoxische Wirkung von Lipofectamine™ hindeutet. Die Transfektion mit Calciumphosphat-

Nanopartikeln führte zu einem kleineren negativen Effekt in der Zellteilung im Vergleich zu Lipofectamine™, und die Zellzahl lag bei 250 % nach 72 h. Die Untersuchungen zeigen, dass die grüne Fluoreszenz der Zellen, die auf die Gen-Expression von transfiziertem Plasmid hindeutet, erst nach der Teilung der Zellen zu beobachten ist. Abbildung 4.2.6 zeigt typische *time-lapse* Aufnahmen von transfizierten HeLa-Zellen und von grün fluoreszierenden Tochterzellen nach der Teilung.

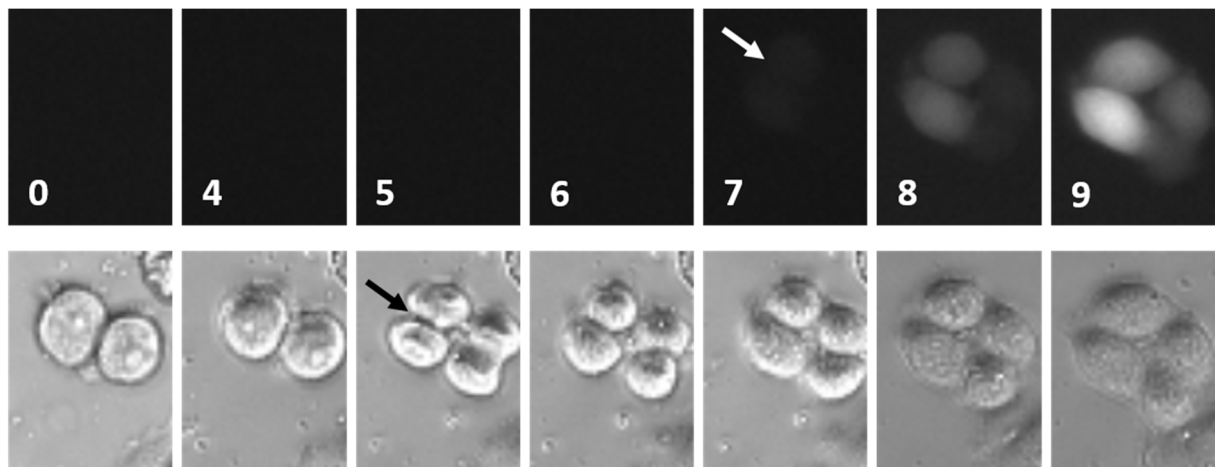


Abb. 4.2.6: Fluoreszenzmikroskopische (oben) und lichtmikroskopische (unten) Aufnahmen von HeLa-Zellen während der ersten 9 h nach Zugabe von aufgereinigten CaP/DNA/CaP/PEI-Nanopartikeln. Der schwarze Pfeil zeigt die geteilte Zelle; der weiße Pfeil zeigt die erkennbare Fluoreszenz in den Tochterzellen.

Die grüne Fluoreszenz von eGFP deutet auf die Gen-Expression von transfizierten pcDNA3-eGFP hin. Alle transfizierten Zellen, die bei diesen Untersuchungen beobachtet wurden, zeigten eine eGFP-Gen-Expression nur nach der Zellteilung. Das wurde ebenfalls für die Zellen, die mit Lipofectamine™ transfiziert wurden, gezeigt (Abb. 4.2.7). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass im Fall von nicht in der Teilung befindlichen Zellen Plasmide nicht oder mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit durch die Kernmembran dringen können.

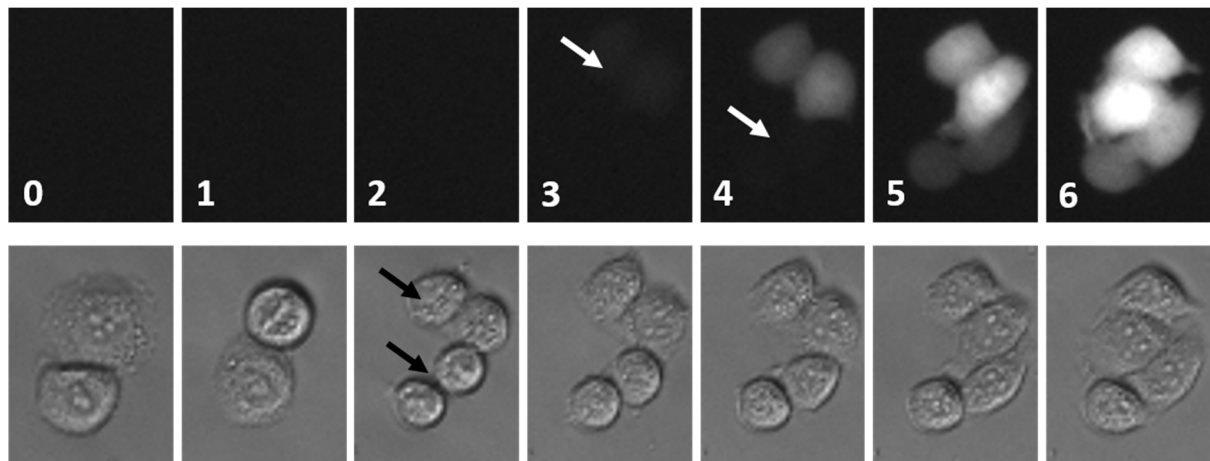


Abb. 4.2.7: Fluoreszenzmikroskopische (oben) und lichtmikroskopische (unten) Aufnahmen von HeLa-Zellen während der ersten 6 h nach Zugabe von Lipofectamine™. Die schwarzen Pfeile zeigen die geteilten Zellen; die weißen Pfeile zeigen die erkennbare Fluoreszenz in den Tochterzellen.

Dies stimmt mit früheren Untersuchungen von nichtviralen Transfektionssystemen an mitotischen Zellen überein.^[85, 87-90, 100, 201, 206] Die Kernmembran baut sich während der Mitose ab,^[207] sodass die Plasmide zu den nuklearen Strukturen durchdringen könnten. Ähnlichen Untersuchungen von Brunner *et al.* bestätigen die Hypothese, dass nichtvirale Transfektionssysteme zwar erfolgreich durch die Zellmembran, aber nicht durch die Zellkernmembran penetrieren können.^[100] Das entspricht auch Untersuchungen von Mintzer *et al.*, welche eine hohe Transfektionsrate bei teilenden Zellen im Vergleich zu nicht-mitotischen Zellen zeigten.^[2] Die unterschiedliche Transfektionseffizienz von gleichen Calciumphosphat-Nanopartikeln an unterschiedlichen Zelllinien kann damit erklärt werden (Kapitel 4.4). Die Möglichkeit, dass Plasmid-DNA nach Transfektion in den Zellkern bei nicht-teilenden Zellen eindringt, kann nicht ausgeschlossen werden. Nach Godbey *et al.* wurden die DNA/PEI-Komplexe im Zellnukleus bei nicht-teilenden Zellen gefunden und führten dabei zu einer Gen-Expression.^[135] Die erfolgreiche Transfektion von sich selten teilenden Hornhaut-Zellen, die mit Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikeln transfiziert wurden, wurde ebenfalls nachgewiesen.^[208]

4.2.4 *In-situ*-Untersuchungen der Gen-Stummschaltung mit Calciumphosphat/siRNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikeln

Die Gen-Stummschaltungs-Experimente wurden an stabil transfizierten HeLa-eGFP-Zellen durchgeführt. Die Nanopartikel-Anzahl, die Calciumphosphat-, DNA- und PEI-Konzentrationen im Zellmedium nach Zugabe der Nanopartikel sind in Tabelle 4.2.3 aufgelistet.

Tab. 4.2.3: Konzentrationen an Calciumphosphat, siRNA und PEI sowie die gesamte Partikelkonzentration pro mL Zellkulturmedium nach Zugabe der Calciumphosphat-Nanopartikel zu den Zellen für die Gen-Stummschaltung.

Probe	Kolloide pro Well / μL	$c(\text{CaP}) /$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{siRNA}) /$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{PEI}) /$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{NP}) \cdot 10^{10} /$ mL^{-1} Zellmedium
Calciumphosphat/siRNA/- Calciumphosphat/PEI- Nanopartikel	120	23,2	3,9	2,5	4,9

Die Gen-Stummschaltung mit Lipofectamine™ wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die siRNA-Konzentration lag für die Gen-Stummschaltung mit Lipofectamine™ bei $1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ pro Well. Die *in-situ*-Mikroskopie wurde 72 h lang unter Zellkulturbedingungen mithilfe der Inkubationskammer durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde nach 7 h gewechselt. Es wurden jeweils zwei Bilder (licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme) pro Stunde von einer Stelle automatisch aufgenommen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte HeLa-eGFP-Zellen. Die Berechnungen der Gen-Stummschaltungs-Effizienz wurden in Kapitel 3.5.7 beschrieben. Abbildung 4.2.8 zeigt die lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen

Aufnahmen für jede zehnte Stunde der Gen-Stummschaltung mit Calciumphosphat-Nanopartikeln sowie mit Lipofectamine™.

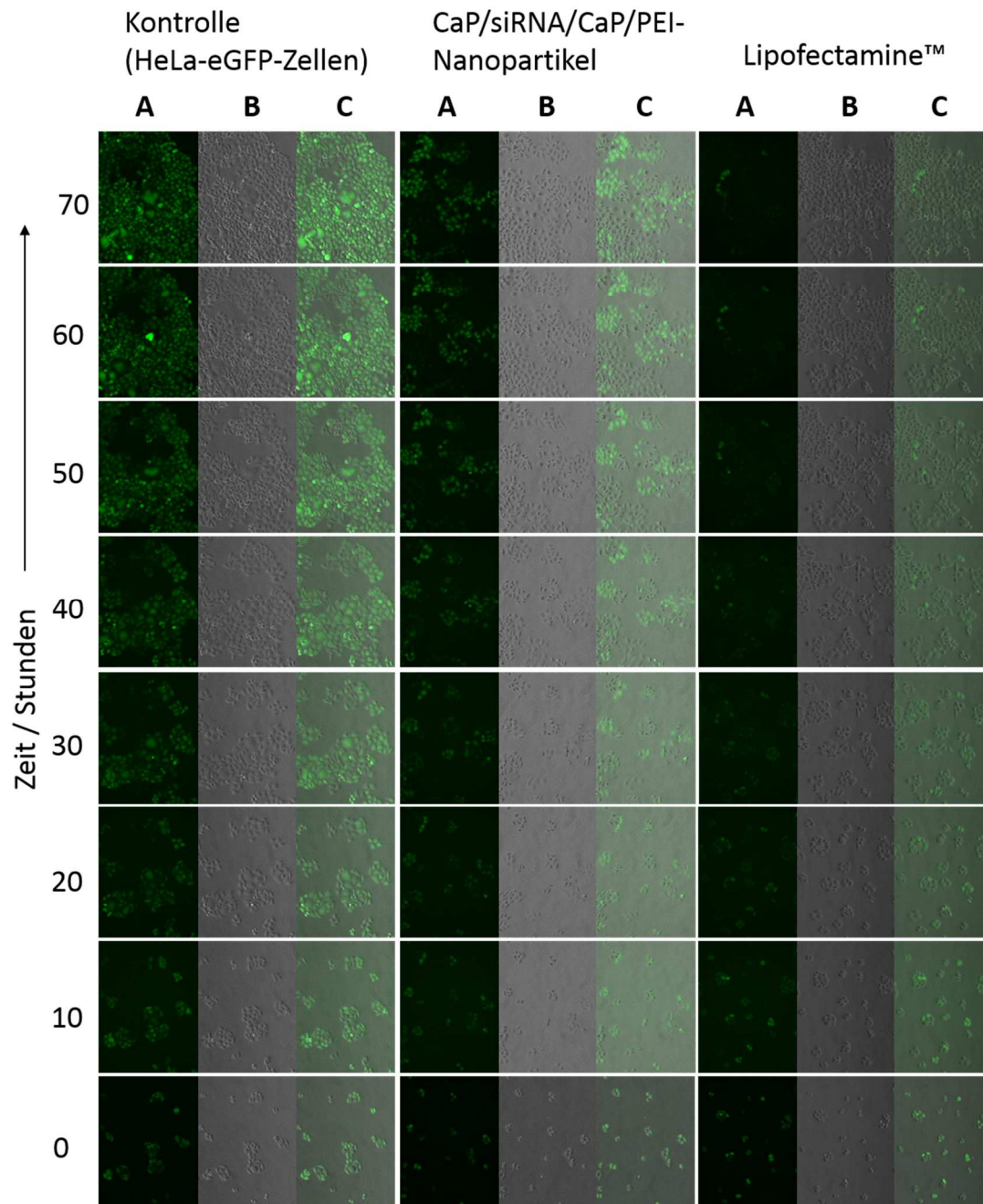


Abb. 4.2.8: Fluoreszenz- (A) und lichtmikroskopische Aufnahmen (B) von HeLa-eGFP-Zellen während der Gen-Stummschaltung mit siRNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln sowie mit Lipofectamine™. (C) Überlagerung von licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

Die Daten der *time-lapse*-Mikroskopie während der Gen-Stummschaltung sind in Abbildung 4.2.9 aufgetragen. Die ersten gen-stummgeschalteten Zellen sind nach 5 h bei ca. 1 % aller Zellen zu sehen. Lipofectamine™ ergab eine Gen-Stummschaltungs-Effizienz von etwa 17 % bereits nach 5 h. Nach etwa 55 h erreichte die Gen-Stummschaltungs-Effizienz der Nanopartikel ihr Maximum und blieb auf diesem Niveau bis zum Ende der Untersuchung. Die mit Lipofectamine™ stummgeschalteten Zellen zeigten ein Maximum nach ebenfalls 55 h (etwa 90 %) und behielten dieses Niveau bei.

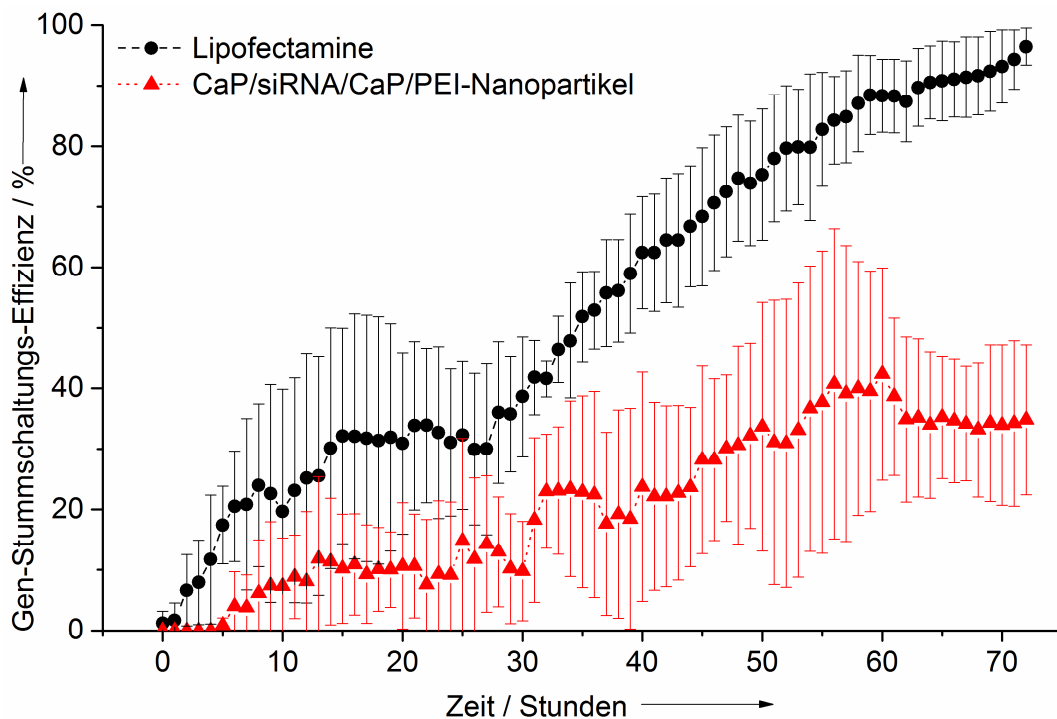


Abb. 4.2.9: Gen-Stummschaltungs-Effizienz von CaP/siRNA/CaP/PEI-Nanopartikeln an HeLa-eGFP-Zellen während einer 72-stündigen Transfektion (N=3). Als Positivkontrolle diente Lipofectamine™.

Die Zellzahl wurde jede Stunde bestimmt und anhand der Zellzahl bei der ersten Aufnahme (normiert auf 100 %) berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.10 dargestellt. Zellvitalität und Proliferation der Zellen während der Gen-Stummschaltung mit Calciumphosphat-Nanopartikeln zeigten keine signifikanten Unterschiede in Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Zellzahl für mit

Lipofectamine™ stummgeschaltete Zellen war niedriger als in der Kontrolle, was auf eine Zelltoxizität von Lipofectamine™ hindeutet.

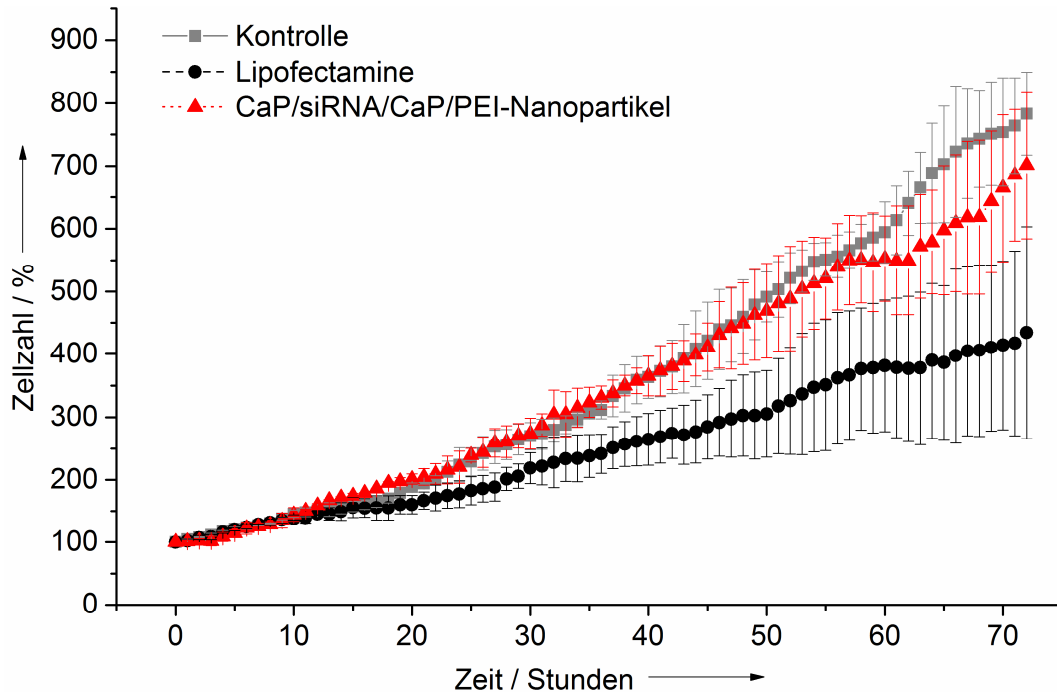


Abb. 4.2.10: Anzahl der HeLa-eGFP-Zellen während einer 72-stündigen Gen-Stummschaltung mit CaP/siRNA/CaP/PEI-Nanopartikeln sowie während der Gen-Stummschaltung mit Lipofectamine™ (N=3). Als Kontrolle dienten unbehandelte HeLa-eGFP-Zellen. Die Zellzahl wurde bei der ersten Aufnahme (0 h) auf 100 % normiert.

Die mithilfe von *ImageJ* gemessenen und auf das Ausgangsintensität-Niveau normierte Fluoreszenzintensität zeigte die gesamte Intensität der Fluoreszenz aller Zellen in einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (Abbildung 4.2.11). Als Ausgangsintensität diente die Fluoreszenzintensität, welche bei der ersten Aufnahme (0 h) auf 100 % normiert wurde. Um die Fluoreszenzintensität mit *ImageJ* berechnen zu können, wurden die Zellaufnahmen als 8-bit-Aufnahmen gespeichert. Bei „*threshold 10*“ wurde von diesen Aufnahmen IntDen (*Integrated density*) automatisch für den gesamten Bereich ermittelt.

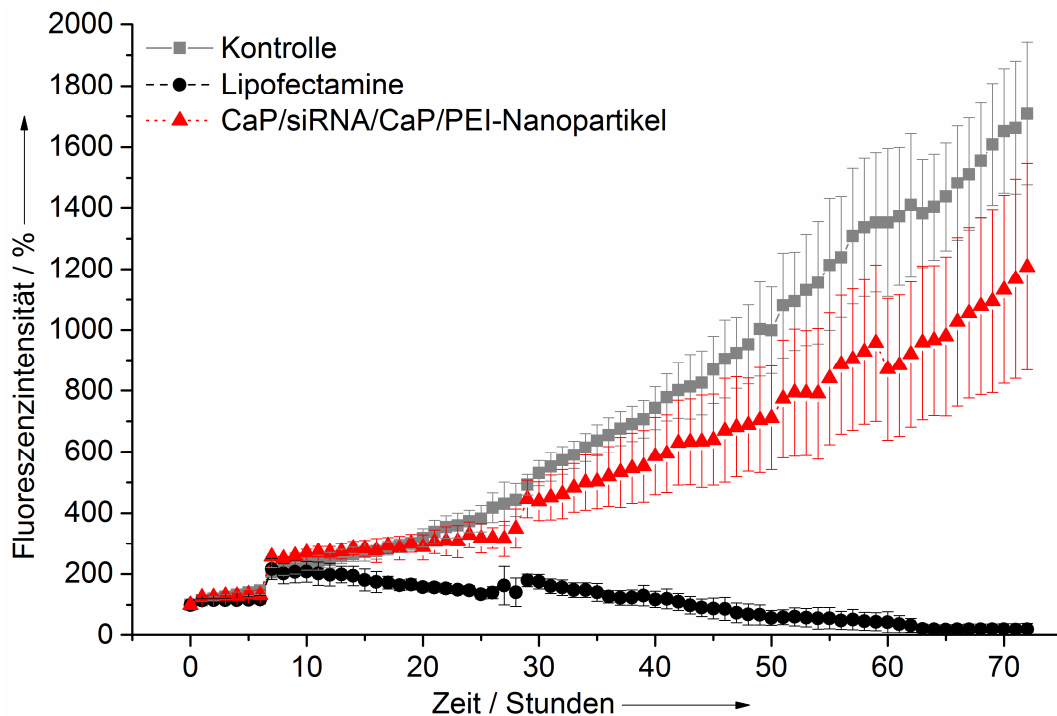


Abb. 4.2.11: Relative Intensität der Fluoreszenz von HeLa-eGFP-Zellen während einer 72-stündigen Gen-Stummschaltung mit CaP/siRNA/CaP/PEI-Nanopartikeln sowie während der Gen-Stummschaltung mit Lipofectamine™ (N=3). Als Kontrolle dienten unbehandelte HeLa-eGFP-Zellen. Die Ausgangsintensität ist die Fluoreszenzintensität, welche bei der ersten Aufnahme gemessen wurde und auf 100 % normiert wurde.

Die erhaltenen mittels *ImageJ* ausgewerteten Daten der Fluoreszenzintensität sind schwierig zu interpretieren. Die schlagartige Erhöhung der Intensität nach 7 h entspricht an dem Zellmediumswechsel. Die mit der Zeit steigende Intensität in Kontrollzellen weist auf die Zellteilung hin. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt das Intensität-Wachstum keinen ausgeprägten Charakter. Bei Lipofectamine™ sinkt die Intensität. Dies kann sowohl über die Gen-Stummschaltung als auch über die Toxizität des Lipofectamins™ hindeuten. Insgesamt bestätigten diese Ergebnisse die Daten, die bei den Gen-Expression-Berechnungen erhalten wurden, sowie auch die Effizienz der Calciumphosphat-Nanopartikel für die Gen-Stummschaltung.

4.2.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der *in-situ*-Untersuchungen zeigten eine deutliche Effizienz der Calciumphosphat-Nanopartikel beim Transport der Nukleinsäuren durch die Zellmembran. Dabei wurde eine niedrige Zytotoxizität der Calciumphosphat-Nanopartikel beobachtet. Die eGFP-Gen-Expression nach Transfektion bei den Tochterzellen deutet darauf hin, dass das transfizierte Plasmid nur beim Abbau der nuklearen Membran abgelesen wird. Die komplizierten Mechanismen der Transfektion sowie die Wege der Plasmid-DNA innerhalb der Zelle nach Überwindung der Barriere der zytoplasmatischen Membran stellen ein interessantes Problem dar. Weitere Untersuchungen der Transfektion von Calciumphosphat-Nanopartikeln mittels *time-lapse* Mikroskopie in synchronisierten Zelllinien sowie auch bei Zellen mit unterschiedlichen Zellteilungsfrequenzen und Zellteilungsrhythmen können die Mechanismen der Transfektion in Zukunft aufklären.

4.3 Transfektion und Gen-Stummschaltung mit Calciumphosphat-Nanostäbchen

4.3.1 Einführung in die Thematik

Die Daten in diesem Kapitel wurden in Zusammenarbeit mit Herrn. Dr. Jan Klesing erhalten. Nanopartikuläres Calciumphosphat wird dank seiner guten Biokompatibilität und Bioresorption in unterschiedlichen Formen wie zum Beispiel Hydroxylapatit in Biologie und Medizin verwendet.^[5, 47, 56, 59, 96, 209-214]

Die Anwendung der Calciumphosphat-Nanopartikel umfasst die Transfektion von Zellen sowie die Gen-Stummschaltung.^[10, 67, 166, 174, 182, 190, 215-218] Ein breites Anwendungsgebiet für Calciumphosphate stellen Knochenersatzmaterialien dar.^[27, 59, 67, 211, 213-214, 219] Ein kommerziell erhältliches Material, welches in Form einer Paste für die Füllung von Knochendefekten angewendet wird, ist Ostim®.^[219] Ostim® ist ein phasenreines Hydroxylapatit in Form von Nanostäbchen in einer wässrigen Dispersion.^[214] Ostim® wurde bereits *in vivo* untersucht, weist eine hohe Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit auf und wird in mehreren Gebieten der Implantologie eingesetzt.^[212-213, 219-224] Die Anwendung dieser Ostim®-Nanostäbchen (im Folgenden als Calciumphosphat-Nanostäbchen bezeichnet) als bioaktiver (osteinduktiver und osteokonduktiver) Bestandteil einer Knochenersatzpaste bzw. als Nukleinsäure-Träger für Gen-Therapie stellt einen interessanten Bereich dar. In dieser Arbeit werden *in-vitro*-Untersuchungen der Transfektion, der Gen-Stummschaltung und der Biokompatibilität der mit DNA- oder siRNA-beladenen Ostim®-Nanostäbchen beschrieben. Abbildung 4.3.1 zeigt schematisch die Struktur der Nanostäbchen.

Die Funktionalisierung der Nanostäbchen mit dem positiv geladenen Polymer Polyethylenimin führt zu einer positiven Ladung und ermöglicht dadurch eine

weitere Beladung der Nanostäbchen mit negativ geladenen Nukleinsäuren (DNA oder siRNA).

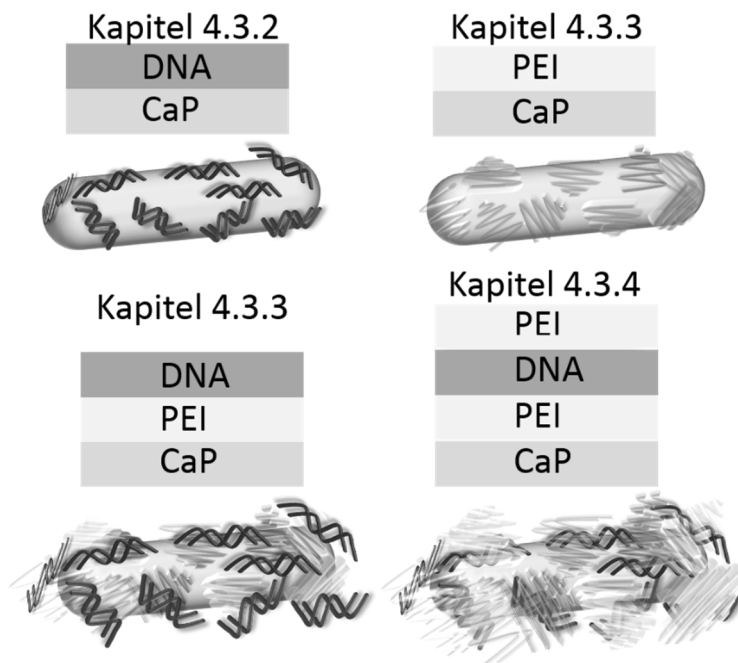


Abb. 4.3.1: Schematische Darstellung von Calciumphosphat/DNA-, Calciumphosphat/PEI-, Calciumphosphat/PEI/DNA- und Calciumphosphat/PEI/DNA/PEI-Nanostäbchen.

Ein wesentlicher Vorteil des PEI als Bestandteil des Transfektionssystems ist der so genannte *proton sponge effect*.^[139]

In dieser Arbeit werden die Calciumphosphat-Nanostäbchen dargestellt, die mit einer (DNA oder siRNA), zwei (PEI/DNA oder PEI/siRNA) oder drei (PEI/DNA/PEI oder PEI/siRNA/PEI) aufeinanderfolgenden Schichten beladen wurden. In der Literatur wurde die aufeinander folgende Adsorption von entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten von Decher *et al.* beschrieben.^[225] Dieses Konzept basiert auf der Fähigkeit von zwei Polyelektrolyten, die entgegengesetzt geladen sind, elektrostatische Bindungen untereinander auszubilden. Dadurch baut sich eine Polyelektrolyt-Multischicht (*polyelectrolyte multilayer film*) auf der Oberfläche auf.^[225-227] Das *Layer-by-layer* Verfahren wurde für die Herstellung von Mikrokapseln,^[228-229] Nanokapseln^[230-231] und für

die Funktionalisierung von Oberflächen^[232-233] einschließlich der Oberflächen von Nanopartikeln^[234] verwendet. Für die Transfektionsuntersuchungen wurden die Calciumphosphat-Nanostäbchen mit pcDNA3-eGFP oder mit anti-eGFP-siRNA beladen und an unterschiedlichen Zelllinien getestet.

4.3.2 Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanostäbchen

4.3.2.1 Charakterisierung

Die Synthese und Charakterisierung der Calciumphosphat-Nanostäbchen wurden von Herrn Dr. Jan Klesing durchgeführt. Die DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen wurden, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, synthetisiert.^[96] Die dargestellten Calciumphosphat-Nanostäbchen wurden mit einer Modell-DNA (*from herring sperm*, $c(\text{DNA}) = 1 \text{ g L}^{-1}$) für die chemische Charakterisierung und mit pcDNA3-eGFP ($c(\text{DNA}) = 1 \text{ g L}^{-1}$) oder mit anti-eGFP-siRNA ($c(\text{siRNA}) = 4,9 \text{ g L}^{-1}$) für Zelluntersuchungen funktionalisiert. Tabelle 4.3.1 enthält die Zusammensetzung der Calciumphosphat-Nanostäbchen.

Tab. 4.3.1: Zusammensetzung und kolloidchemische Charakterisierung der Calciumphosphat/DNA-Nanostäbchen, die mit Modell-DNA funktionalisiert wurden.

Probe	$c(\text{CaP}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) / \text{mg mL}^{-1}$	PDI	Durchmesser (DLS) / nm	Größe (REM) / nm	ζ -Potential / mV
Calciumphosphat/DNA-Nanostäbchen	0,6	0,5	0,01	152	103±40 (Länge) 32±5 (Breite)	-55±7

Die Größe und das Zetapotential der Calciumphosphat-Nanostäbchen wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Die Calciumphosphat/DNA-Nanostäbchen (CaP/DNA-NS) besitzen eine stark negative Ladung (-55 mV) aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Der hydrodynamische Durchmesser der Nanostäbchen lag bei 150 nm. In diesem Fall kann man davon ausgehen, dass der mittels DLS ermittelte Durchmesser der Länge der Stäbchen entspricht.^[235-236] Der PDI von 0,01 bestätigt den monodispersen Charakter der Dispersion. Abbildung 4.3.2 zeigt Nanostäbchen (A), die mit DNA-beladenen Nanostäbchen (B) und die mit PEI-beladenen Nanostäbchen (C).

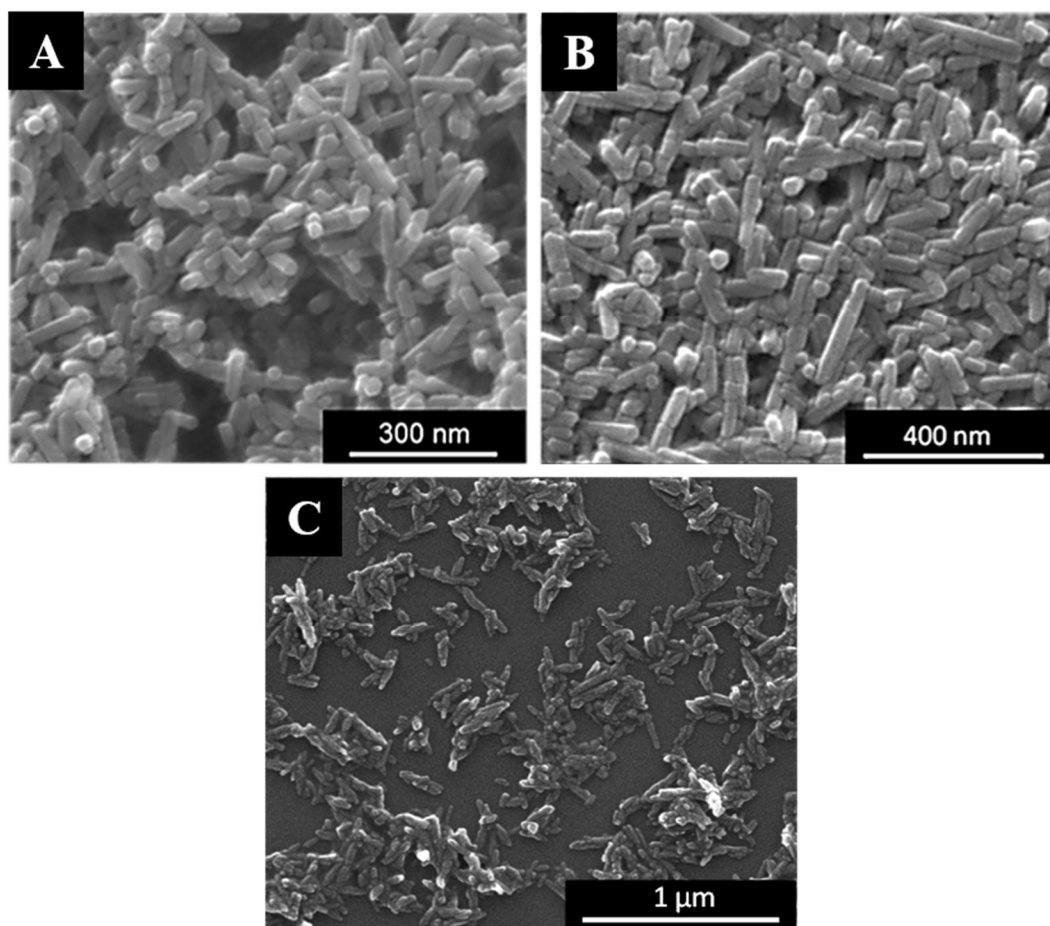


Abb. 4.3.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Calciumphosphat-Nanostäbchen (A), der DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen (B) und der PEI-beschichteten Calciumphosphat-Nanostäbchen (C).

Die DNA- sowie die PEI-stabilisierten Nanostäbchen zeigen im REM die gleiche stäbchenförmige Morphologie. Die Länge von durchschnittlich 100 nm und die Breite von durchschnittlich 30 nm der DNA-beladenen Stäbchen wurden mithilfe von *ImageJ* ermittelt. Die durchschnittliche Länge der Nanostäbchen im REM bestätigt die mittels DLS erhaltenen Daten, sofern man den hydrodynamischen Durchmesser berücksichtigt.^[181]

4.3.2.2 Transfektion, Gen-Stummschaltung und Zellvitalität

Für die biologischen Untersuchungen wurden die Nanostäbchen mit pcDNA3-eGFP ($c(\text{DNA}) = 1 \text{ g L}^{-1}$) oder mit siRNA ($c(\text{siRNA}) = 4,9 \text{ g L}^{-1}$) beladen. Die Synthese der Nukleinsäure-funktionalisierten Nanostäbchen wurde von Herrn Dr. Jan Klesing durchgeführt und in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

Die Transfektionsuntersuchungen wurden an HeLa- und T24-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle diente Polyfect®. Polyfect® besteht aus sphärischen Dendrimeren, die positiv geladene Aminogruppen für den Kontakt mit negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäure zur Verfügung stellen. Der kompakte DNA-Polyfect®-Komplex bindet an der Membranoberfläche und wird mittels unspezifischer Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Um möglichst hohe Transfektionseffizienzen zu erhalten, wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen an Nanostäbchen pro Well getestet. Die verwendeten Konzentrationen an DNA, siRNA und Calciumphosphat sind in Tabelle 4.3.2 dargestellt.

Die Anzahl von Calciumphosphat-Nanostäbchen $N(NS)$ wurde wie in Kapitel 3.3 beschrieben als

$$N(NS) = \frac{m(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)}{m(NS)} \quad (3.3.1)$$

berechnet. $m(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)$ ist die Masse alle Nanostäbchen pro m^3 und $m(NS)$ ist die Masse des einzelnen Calciumphosphat-Nanostäbchen.

Für Calciumphosphat-Nanostäbchen (NS), die eine charakteristische zylindrische Form besitzen und phasenreinen Hydroxylapatit darstellen, wurde die Dichte mit 3140 kg m^{-3} angenommen und die Masse des einzelnen Nanostäbchen $m(NS)$ nach folgender Gleichung bestimmt:

$$m(NS) = \pi \cdot r(NS)^2 \cdot h(NS) \cdot \rho(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6) = \quad (3.3.4)$$

$$= 3,14 \cdot 225 \cdot 10^{-18} m^2 \cdot 100 \cdot 10^{-9} m \cdot 3140 \text{ kg} \cdot m^{-3} =$$

$$= 2,2 \cdot 10^{-10} \mu g,$$

wobei die mittlere Länge von Nanostäbchen $h(NS)=100 \text{ nm}$ und der Radius $r(NS)=15 \text{ nm}$ anhand der REM-Aufnahmen mithilfe von *ImageJ* ermittelt wurden.

Bei der Transfektion wurden $37 \mu\text{L}$ der Nanostäbchen-Dispersion in $500 \mu\text{L}$ des Mediums pro Well gegeben. Das entspricht einer Masse des Calciumphosphats $m(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)$ von $44 \mu\text{g}$ pro mL Zellkulturmedium. Die Anzahl der Nanostäbchen im Well ergibt sich als

$$N(NS) = \frac{m(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)}{m(NS)} = \quad (3.3.5)$$

$$= \frac{44 \mu g}{2,2 \cdot 10^{-10} \mu g} =$$

$$= 1,98 \cdot 10^{11} \approx 2,0 \cdot 10^{11}$$

Nanostäbchen pro mL Zellmedium.

Bei der Zugabe von 67 μ L der Nanostäbchen-Dispersion in 500 μ L des Mediums pro Well entspricht die Masse $m(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)$ = 83 μ g. Somit beträgt die Anzahl der Nanostäbchen

$$N(NS) = \frac{m(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)}{m(NS)} = \quad (3.3.5)$$

$$= \frac{83 \mu g}{2,2 \cdot 10^{-10} \mu g} =$$

$$= 3,7 \cdot 10^{11}$$

Nanostäbchen pro mL Zellmedium im Well.

Die Konzentrationen der siRNA- und DNA-funktionalisierten Calciumphosphat/Nanostäbchen pro mL Zellkulturmedium im Well sind in Tabelle 4.3.2 gezeigt.

Tab. 4.3.2: Zusammensetzungen der Calciumphosphat-, DNA- und siRNA-Konzentrationen und der gesamten Stäbchen-Konzentration pro mL Zellkulturmedium nach Zugabe der pcDNA3-eGFP- oder siRNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen zu den Zellen für die Transfektion oder für die Gen-Stummschaltung.

Probe	Abkürzung	Nanopartikel-Dispersion pro Well / μL	$c(\text{CaP}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{siRNA}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{NP}) \cdot 10^{11} / \text{mL}^{-1}$ Zellmedium
Calciumphosphat/DNA-Nanostäbchen	CaP/DNA-NS	37	44	37	0	2,0
		67	83	68	0	3,7
Calciumphosphat/siRNA-Nanostäbchen	CaP/siRNA-NS	27	42	0	62	1,9
		53	87	0	120	3,9

Abbildungen 4.3.3 und 4.3.4 stellen die fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Aufnahmen von transfizierten HeLa- und T24-Zellen dar.

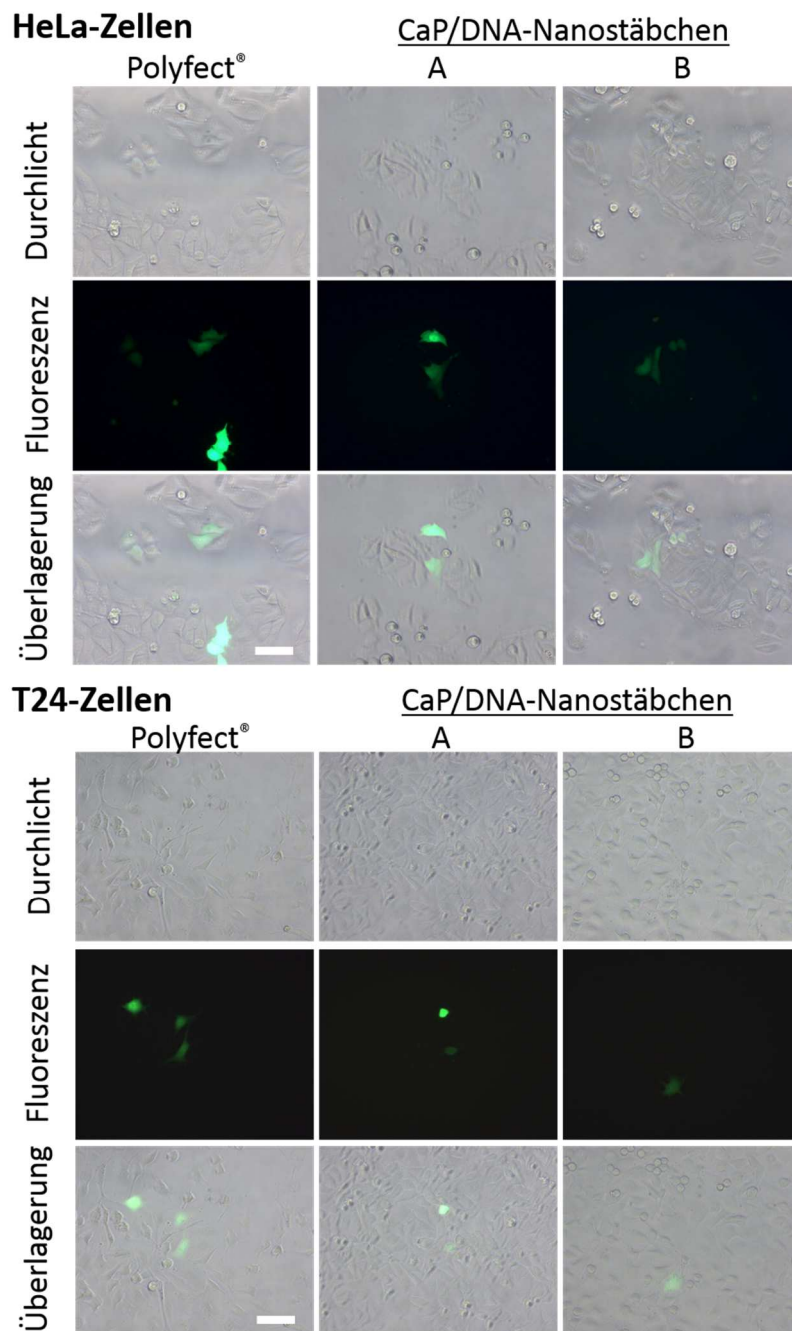


Abb. 4.3.3: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen und T24-Zellen nach der Transfektion mit pcDNA3-eGFP-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen sowie mit Polyfect®. (A) CaP/DNA-NS mit einer Nanostäbchen-Konzentration von $2,0 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$ Zellkulturmedium und (B) CaP/DNA-NS mit einer Nanostäbchen-Konzentration von $3,7 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$ Zellkulturmedium. Die Skala entspricht $50 \mu\text{m}$.

Die Aufnahmen demonstrieren, dass nur vereinzelt Zellen eine grüne eGFP-Fluoreszenz zeigen. Da die freien Plasmide nicht durch die Zellmembran penetrieren können,^[102] gehört die beobachtete grüne Fluoreszenz nur zu den Plasmiden, die auf der Oberfläche der Nanostäbchen adsorbiert sind.

Die mittels Fluoreszenzmikroskopie erhaltenen Daten wurden quantitativ ermittelt und in Form eines Diagramms zusammengefasst (Abbildung 4.3.4).

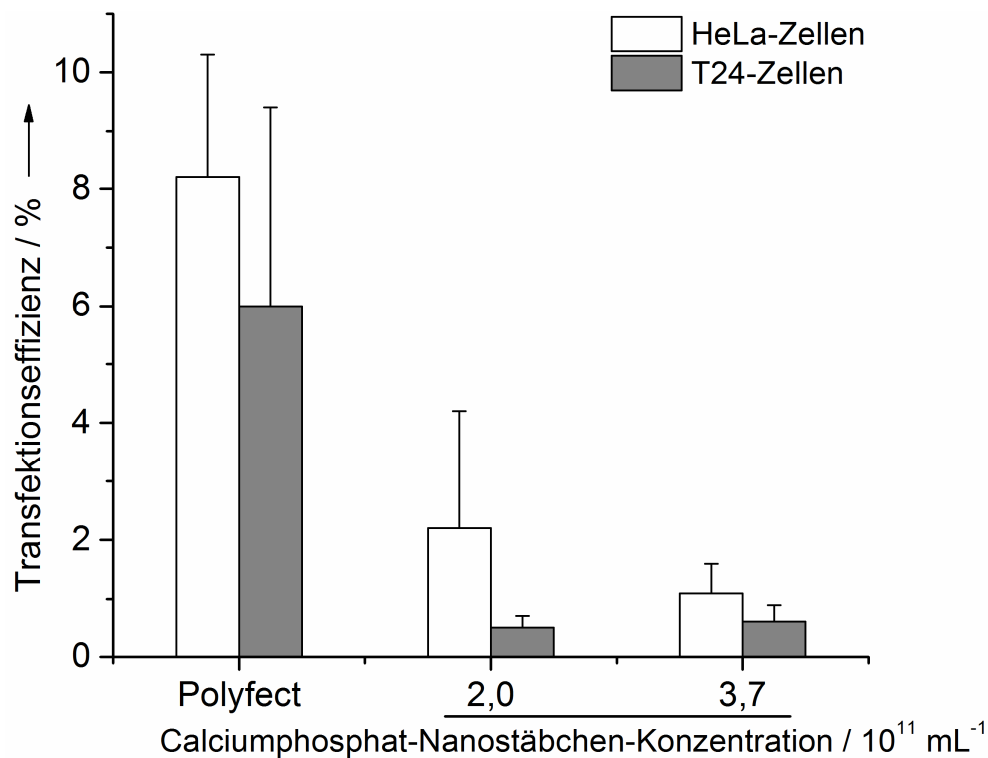


Abb. 4.3.4: Transfektionseffizienz von HeLa- und T24-Zellen nach der Transfektion mit pcDNA3-eGFP-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen und Polyfect®.

Die Transfektionseffizienz der Nanostäbchen lag bei etwa 2 % der HeLa-Zellen und bei etwa 1 % der T24-Zellen. Diese Ergebnisse sind mit den Transfektionen nach der Standard-Calciumphosphat-Methode von Graham und van der Eb vergleichbar.^[110]

Die Effizienz von Calciumphosphat-Nanostäbchen ist vergleichbar mit den Effizienzen von in Kapitel 4.1 beschriebenen Calciumphosphat-Nanopartikeln, die mit pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase-kodierendem Plasmid beladen wurden. Diese Systeme zeigen eine negative Oberflächenladung. Polyfect® führt zu einer Effizienz von etwa 8 %. Bei der Transfektion von Zellen mit Polyfect® wird die DNA von lysosomalen Enzymen geschützt. Laut Aussage des Herstellers beeinflusst Polyfect® den pH-Wert in Endosomen, sodass DNA-Polyfect® Komplexe stabil sind. Nach der endozytotischen Aufnahme von Calciumphosphat/DNA-Nanostäbchen in die Zelle befinden sich die Nanostäbchen in den Endosomen.^[6, 191] Die an die Calciumphosphate gebundene DNA wird mit hoher Wahrscheinlichkeit von lysosomalen Enzymen zerstört. Diese Tatsache kann auch erklären, warum keine Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der DNA-Konzentration beobachtet wurde. Die Anwendung der doppelten Menge an Nanostäbchen und dementsprechend der doppelte DNA-Menge führte zu ähnlichen Effizienzen.

Abbildung 4.3.5 zeigt die Auswertung des MTT-Tests zur Bestimmung der Vitalität von transfizierten Zellen.

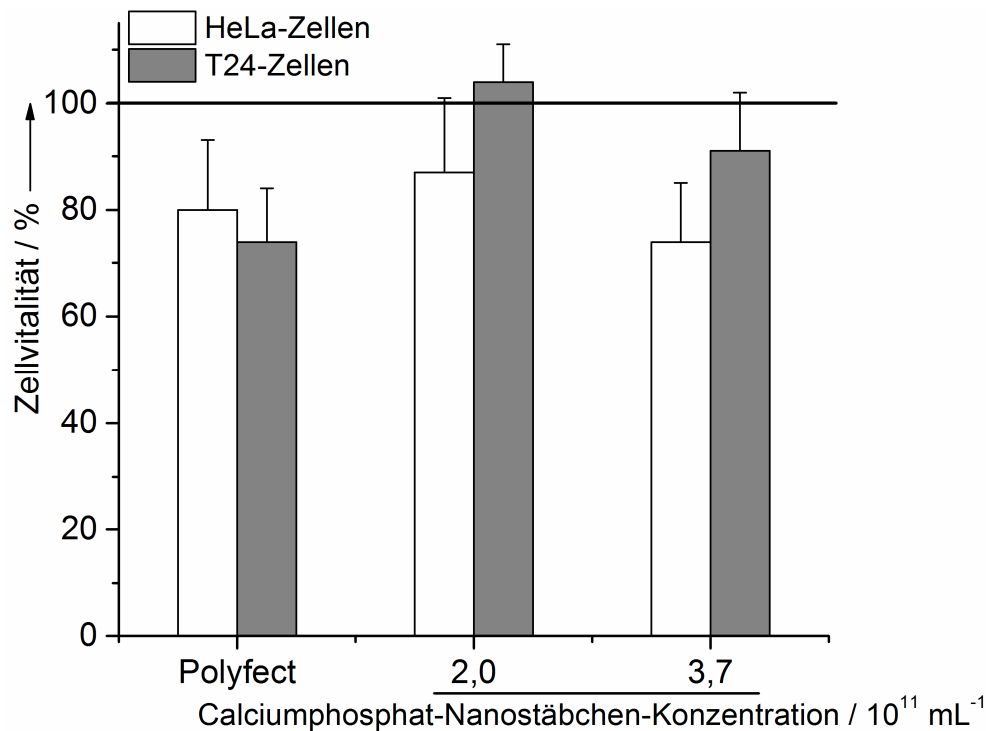


Abb. 4.3.5: Vitalität der HeLa- und T24-Zellen nach der Transfektion mit pcDNA3-eGFP-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen und Polyfect®. Die Vitalität von nichttransfizierten Zellen wurde auf 100 % normiert.

Calciumphosphat-Nanopartikel sind biokompatibel und nicht zytotoxisch.^[174, 190] Die hergestellten Nanostäbchen zeigen im MTT-Test keine Zytotoxizität. Die Zellvitalität bei der Transfektion der Zellen mit $2,0 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$ Nanostäbchen lag zwischen 80 und 100 %. Minimaler Einfluss auf die Zellvitalität zeigten die Nanostäbchen bei Verwendung einer höheren Konzentration ($3,7 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$). Da lag die Calciumphosphat-Konzentration bei $83 \mu\text{g mL}^{-1}$, was $42 \mu\text{g}$ pro Well entspricht. Die hohen Konzentrationen von Calcium können toxische Wirkungen auf Zellen zeigen und zur Apoptose führen.^[216, 237] Allerdings fanden Neumann *et al.* für die Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel keinen zytotoxischen Effekt.^[216] Nur geringe Konzentrationen an Calcium im Vergleich zur Standard-Calciumphosphat-Methode wurden innerhalb der Zelle detektiert.^[216] Neben dem geringfügigen zytotoxischen Effekt von Calciumphosphat-Nanostäbchen, welcher für HeLa-Zellen nur bei einer hohen Konzentration beobachtet wurde, zeigte Polyfect® eine verringerte Zellvitalität von 80 % nach der Transfektion von

beiden Zelllinien. Die Untersuchungen der Gen-Stummschaltung erfolgten an stabil transfizierten HeLa-eGFP-Zellen. Abbildung 4.3.6 stellt die repräsentativen fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Aufnahmen von HeLa-eGFP-Zellen nach der Gen-Stummschaltung sowie von nicht behandelten HeLa-eGFP-Zellen dar.

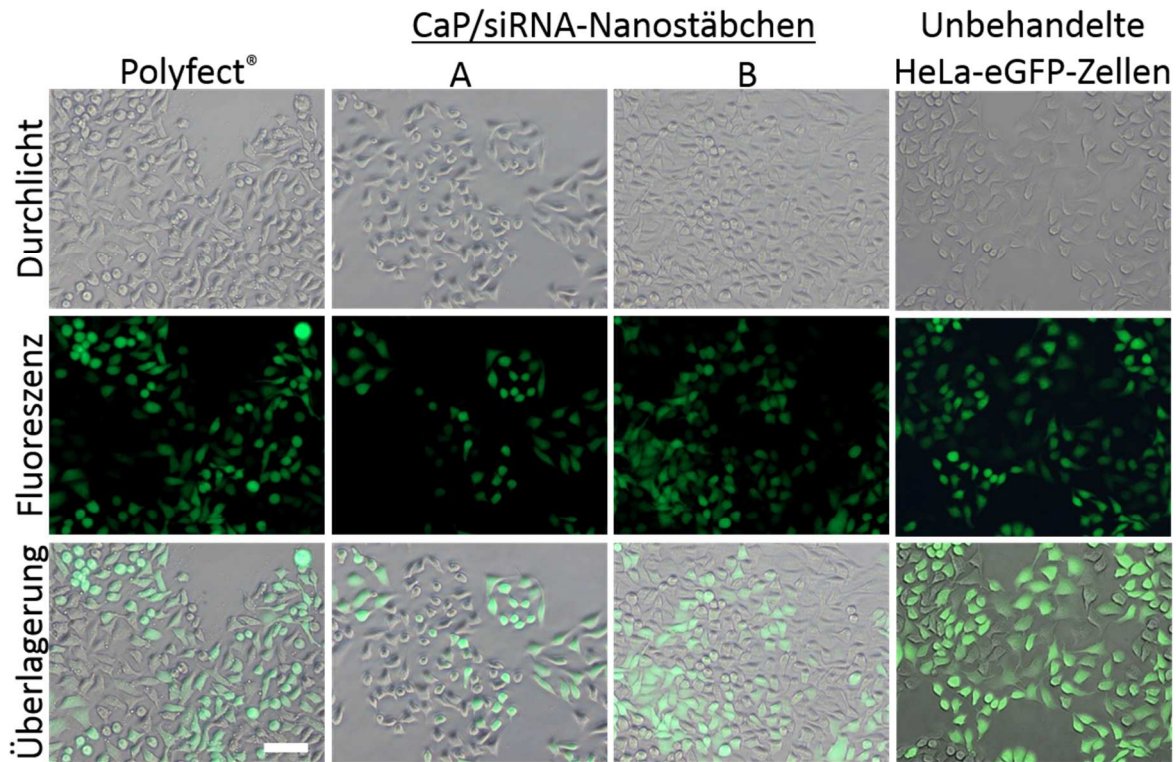


Abb. 4.3.6: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen von HeLa-eGFP-Zellen nach der Gen-Stummschaltung mit CaP/siRNA-NS mit einer Nanostäbchen-Konzentration (A) von $1,9 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$ und (B) von $3,9 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$ Zellkulturmedium sowie mit Polyfect®. Die Skala entspricht $50 \mu\text{m}$.

Die quantitativen Auswertungen der Gen-Stummschaltungs-Effizienz wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben durchgeführt und in Abbildung 4.3.7 gezeigt. Für beide Konzentrationen der Nanostäbchen wurden vergleichbare Gen-Stummschaltungs-Effizienzen erhalten.

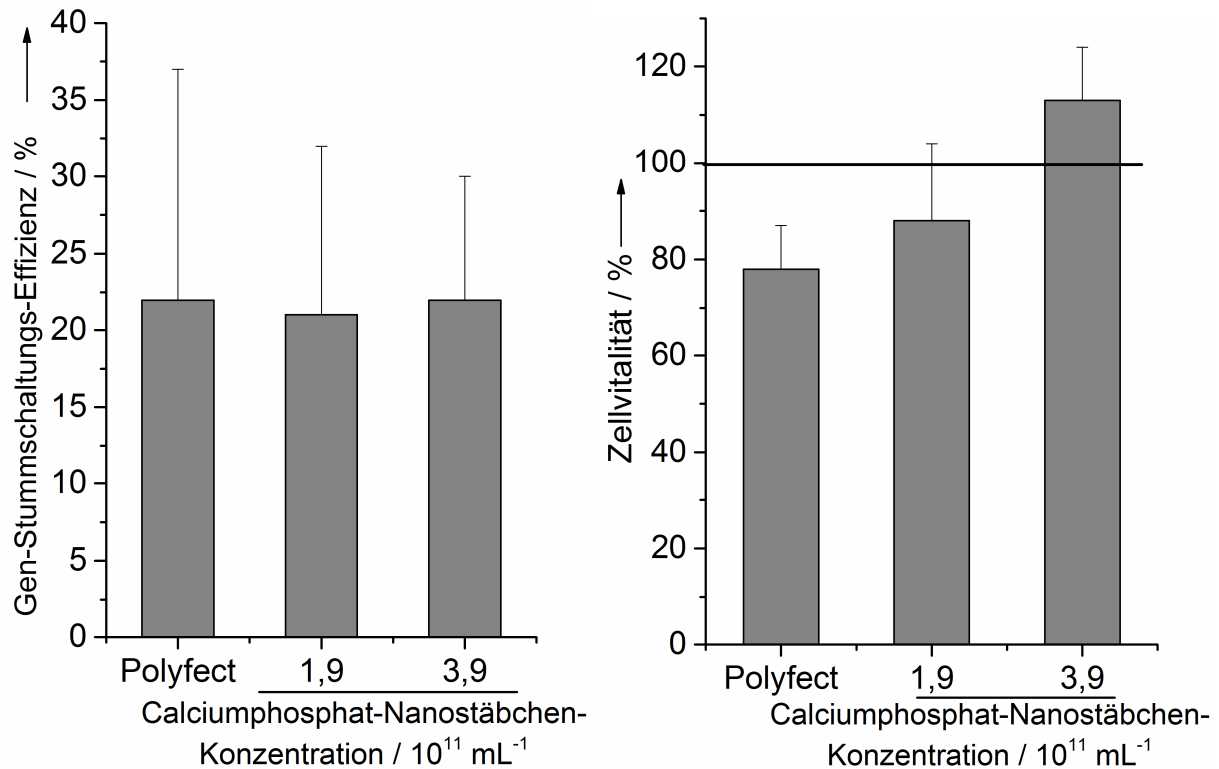


Abb. 4.3.7: Gen-Stummschaltungs-Effizienz (links) und Vitalität (rechts) von HeLa-eGFP-Zellen nach der Gen-Stummschaltung mit den siRNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen sowie mit Polyfect®. Die Vitalität der nichttransfizierten Zellen wurde auf 100 % normiert.

Bei Polyfect® lag die Gen-Stummschaltungs-Effizienz der Nanostäbchen bei etwa 20 %. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den publizierten Ergebnissen von Sokolova *et al.*^[182] Die von Sokolova beschriebenen Calciumphosphat/siRNA-Nanopartikel wurden mit der gleichen siRNA funktionalisiert. Die siRNA-Konzentration für die Gen-Stummschaltung lag bei 7,6 µg pro Well.^[182] Allerdings wurden die hier beschriebenen Calciumphosphat/siRNA-Nanostäbchen auf die Calciumphosphat-Konzentration normiert. Deshalb wurde eine größere siRNA-Konzentration in den Zellexperimenten verwendet (31 µg siRNA pro Well). Die Zellvitalitätsuntersuchungen zeigten im Gen-Stummschaltungs-Experiment keine Konzentrationsabhängigkeit. Polyfect® zeigte für HeLa-eGFP-Zellen sowie für HeLa- und T24-Zelllinien eine geringe zytotoxische Wirkung.

4.3.3 Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat/ PEI-Nanostäbchen

Die negativ geladenen Nukleinsäure-beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen weisen eine niedrige Transfektionseffizienz in *in-vitro*-Untersuchungen auf. Die Umladung der Calciumphosphat-Nanostäbchen mit einem positiv geladenen Polymer sollte die Oberflächenladung ändern. Dafür wurden die Calciumphosphat-Nanopartikel mit positiv geladenem Polyethylenimin (PEI, verzweigt, 25 000 Da) funktionalisiert. Die Synthese der PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen erfolgte nach in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Verfahren.^[8] Die Herstellung und Charakterisierung der Nanostäbchen wurden von Herrn Dr. Jan Klesing durchgeführt.

Abbildung 4.3.2 (C) zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der PEI-beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen. Es besteht kein Unterschied in der Morphologie und in der Größe der Nanopartikel im Vergleich zu nicht beladenen Nanostäbchen. Mittels *ImageJ* wurde eine Länge von 112 ± 37 nm und eine Breite von 30 ± 6 nm der Nanostäbchen ermittelt. Das Zetapotential lag bei +43 mV. Die PEI-beladenen Nanostäbchen wurden mit unterschiedlichen Mengen an pcDNA3-eGFP oder siRNA funktionalisiert und für die Transfektion oder die Gen-Stummschaltung verwendet. Die zellbiologischen Untersuchungen wurden an HeLa-, HeLa-eGFP- und MG-63-Zellen durchgeführt. Für die Transfektion wurden 37 μ L der Kolloide pro Well verwendet. Weitere Durchführungen der Transfektion erfolgten wie oben beschrieben.

4.3.3.1 pcDNA3-eGFP-funktionalisierte Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen

Die Charakterisierung der DNA-beladenen Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen wurde mittels DLS durchgeführt.^[8] Abbildung 4.3.8 zeigt die Ergebnisse der Messungen des Zetapotentials und des hydrodynamischen Durchmessers.

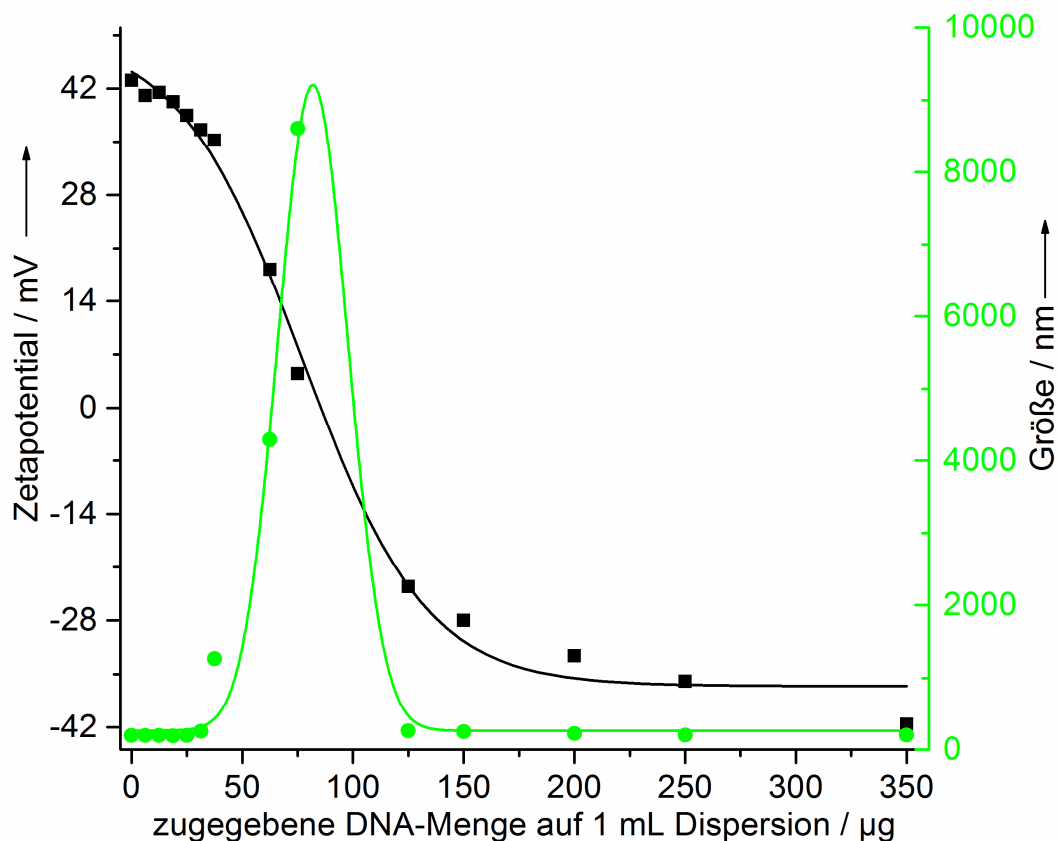


Abb. 4.3.8: Zetapotential und hydrodynamischer Durchmesser der CaP/PEI-Nanostäbchen, die mit unterschiedlichen Mengen an pcDNA3-eGFP beladen wurden.

Nach Zugabe von kleinen Mengen der pcDNA3-eGFP (von 6,25 µg bis 31,3 µg) zu den Nanostäbchen bleibt das Zetapotential im positiven Bereich von +42 bis +35 mV, was auf eine kolloidale Stabilität des Systems hindeutet. Der Durchmesser der Nanostäbchen bei diesen DNA-Konzentrationen lag bei etwa 200 nm. Bei Erhöhung der DNA-Konzentration (Zugabe von 37,5 µg, 62,5 µg

und 75 µg DNA) wächst dementsprechend mit der Menge an negativ geladenen Phosphatgruppen im System. Infolgedessen sinkt das Zetapotential auf bis zu 0 mV. Bei solchen Parametern weist das System keine elektrostatische Stabilität mehr auf, was zu einer Agglomeration führen kann. Mittels einer Größenbestimmung konnten Agglomerate gefunden werden. Die DLS-Messung ergab einen Durchmesser von 9 µm. Eine weitere Zugabe an DNA (125 µg bis 350 µg) führte zur Umladung der Nanostäbchen. Das Zetapotential lag im anionischen Bereich (etwa -40 mV). Der mittels DLS-Messungen bestimmte hydrodynamische Durchmesser der Nanostäbchen lag bei etwa 200 nm. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Zugabe einer ausreichenden DNA-Menge eine Umladung der Stäbchen vom kationischen in den anionischen Bereich stattfindet. Die zusätzliche Schicht der DNA führte zu einer elektrostatischen Stabilisierung der Nanostäbchen in wässriger Lösung und zur kolloidalen Stabilität des Systems. Die Untersuchungen der Transfektion für alle Varianten der Nanostäbchen fanden an HeLa- und MG-63-Zellen statt.

Abbildung 4.3.9 zeigt repräsentative fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen bzw. MG-63-Zellen, die nach der Transfektion mit Calciumphosphat/PEI/DNA-Nanostäbchen aufgenommen wurden. Dabei wurden die Nanostäbchen mit einer positiven Oberflächenladung („kationischer Bereich“) sowie mit einer negativen Oberflächenladung („anionischer Bereich“) untersucht. Zudem wurden Partikel, die Agglomerationserscheinungen zeigten („agglomerierter Bereich“), untersucht.

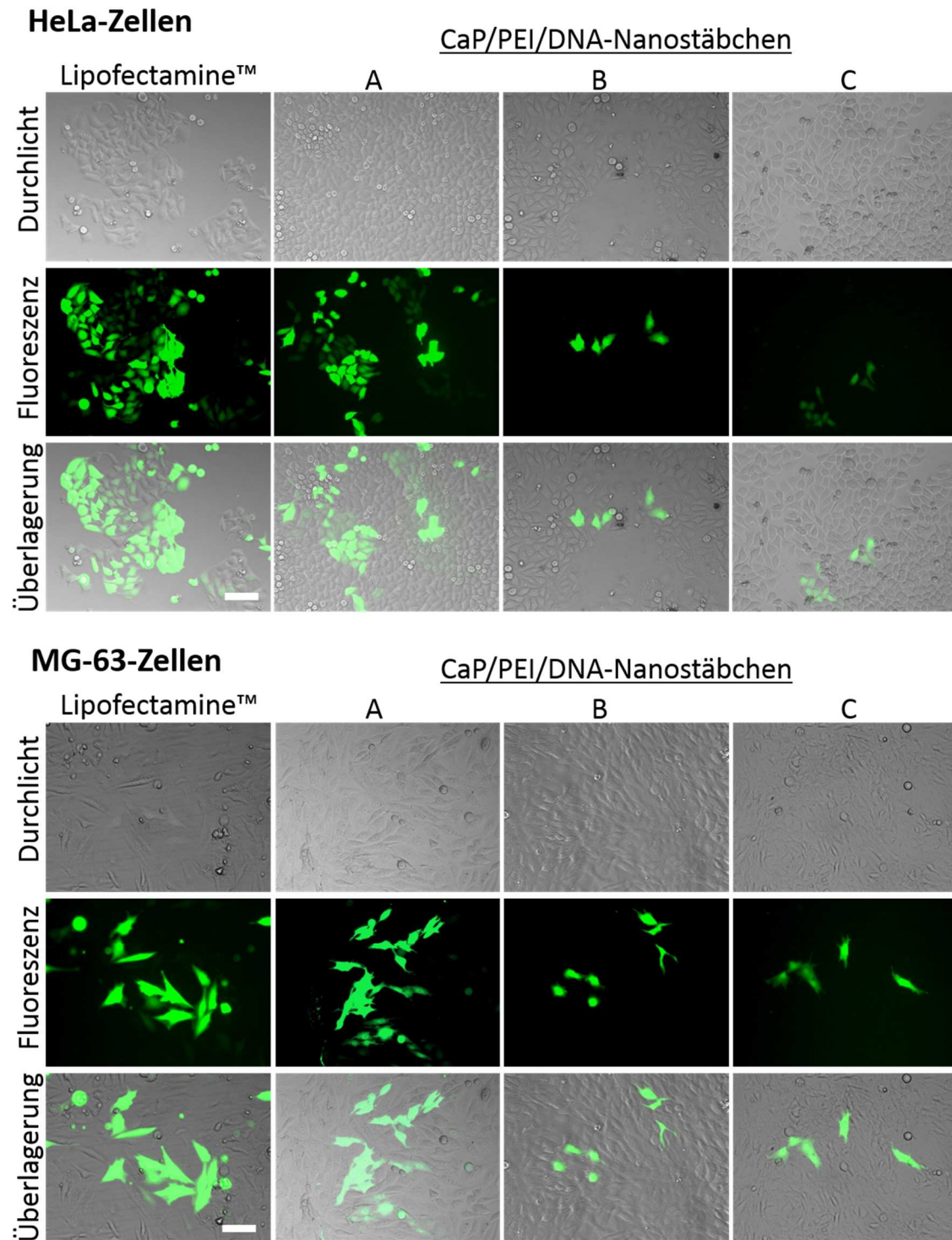


Abb. 4.3.9: Fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HeLa- und MG-63-Zellen nach der Transfektion mit pcDNA3-eGFP-funktionalisierten CaP/PEI-Nanostäbchen aus dem „kationischen Bereich“ (A), dem „agglomerierten Bereich“ (B), dem „anionischen Bereich“ (C) und nach der Transfektion mit Lipofectamine™. Die Skala entspricht 50 µm.

Die positiv geladenen Nanostäbchen zeigten bei der Transfektion von HeLa-Zellen eine höhere Effizienz (etwa 7 %) als die negativ geladenen (etwa 1 %) oder als die agglomerierten Nanostäbchen (etwa 2 %) (Abbildung 4.3.10). Die Transfektionsrate für die negativ geladenen Nanostäbchen ist vergleichbar mit der Transfektion der DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen, die in Kapitel 4.3.2 beschrieben wurden. Die höchste Transfektionseffizienz wurde bei den Nanostäbchen, die noch eine positive Oberflächenladung besitzen, beobachtet.

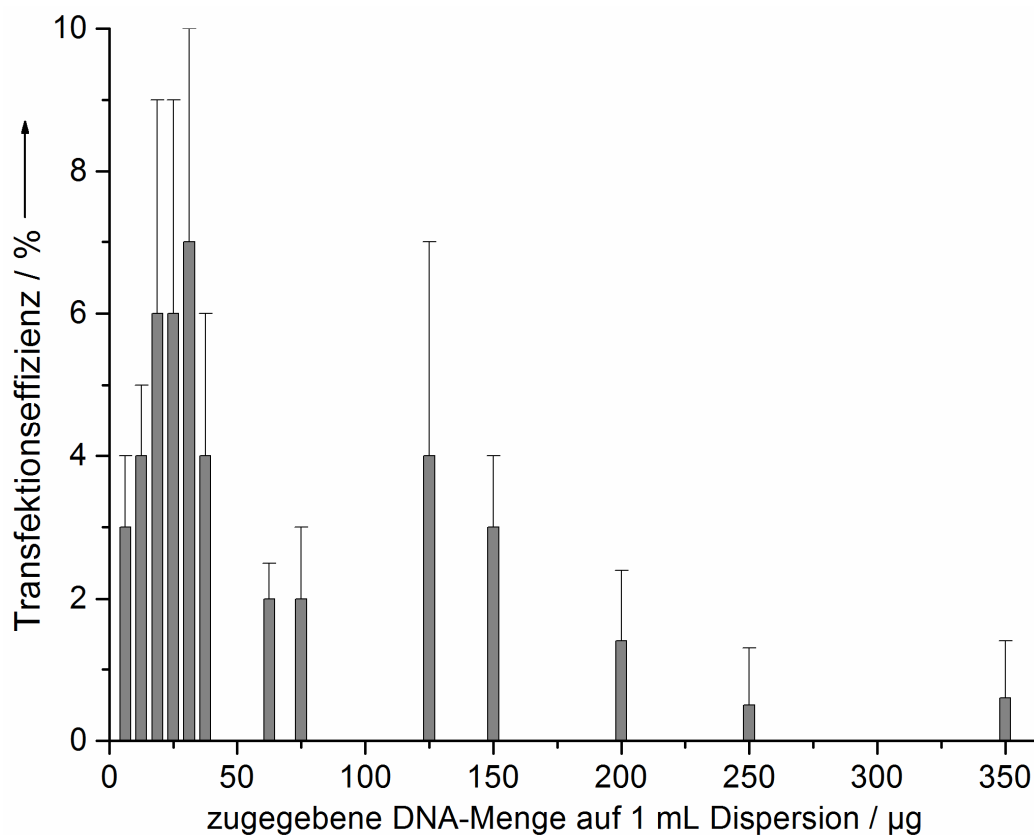


Abb. 4.3.10: Transfektionseffizienzen von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit CaP/PEI-Nanostäbchen, die mit unterschiedlichen Mengen an pcDNA3-eGFP beladen wurden.

Es konnte keine Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der DNA-Menge im zugegebenen Kolloid beobachtet werden. Diese Tatsache könnte beweisen, dass für eine erfolgreiche Transfektion nicht die DNA-Konzentration, sondern die Ladung der DNA-Träger eine wesentliche Rolle spielt. Die Calciumphosphat-

Konzentration im Kolloid vor der DNA-Zugabe wurde mit $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ berechnet (Kapitel 3.2.4). Bei einer gegebenen Länge und Breite der Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen und laut Gleichung 3.4.5 wurde die Nanopartikel-Konzentration pro Well mit $9 \cdot 10^{10} \text{ mL}^{-1}$ bei Zugabe von $6,25 \text{ }\mu\text{g}$ DNA und mit $7 \cdot 10^{10} \text{ mL}^{-1}$ bei Zugabe von $350 \text{ }\mu\text{g}$ DNA berechnet. Deshalb besteht kein wesentlicher Unterschied in der Nanostäbchen-Konzentration für Systeme mit maximaler oder minimaler DNA-Menge. Außerdem erzeugte eine Verdoppelung der Nanostäbchen-Konzentrationen, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, keine Unterschiede in der Transfektionseffizienz.

Transfektionsergebnisse von MG-63-Zellen zeigen den Einfluss der Ladung des Systems auf die Transfektion (Abbildung 4.3.11).

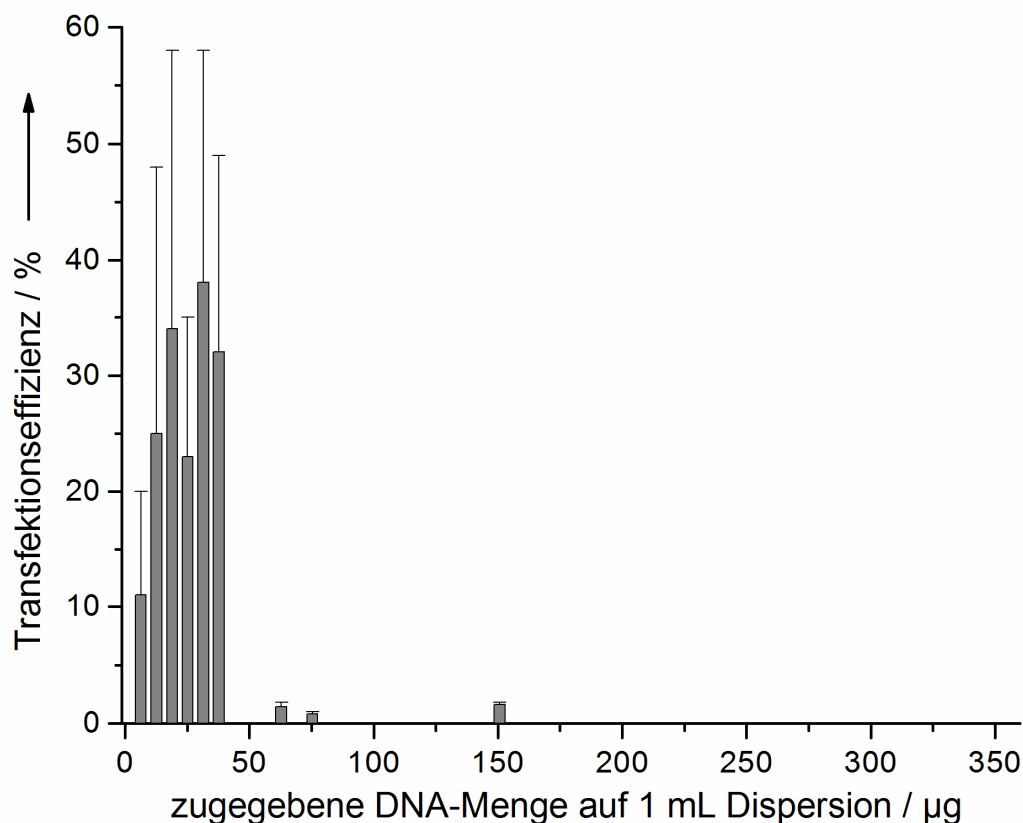


Abb. 4.3.11: Transfektionseffizienzen von MG-63-Zellen nach der Transfektion mit CaP/PEI-Nanostäbchen, die mit unterschiedlichen Mengen an pcDNA3-eGFP beladen wurden.

Hier erreichte die Transfektionseffizienz von kationischen Nanostäbchen etwa 40 %. Die Agglomerate und negativ geladenen Nanostäbchen zeigten eine Effizienz von 1 % oder weniger. Die Transfektionseffizienz der anionischen Nanostäbchen ist bei beiden Zelllinien mit der von negativ geladenen Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln^[10, 190] vergleichbar.

Die Differenz in der Transfektionseffizienz der positiv geladenen Nanostäbchen bei den unterschiedlichen Zelllinien kann nicht eindeutig erklärt werden. Eine mögliche Begründung dafür kann die Differenz in der Frequenz der Zellzyklusphase der Zelllinien sein.^[88, 100, 206]

Als Kontrolle wurden zwei kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien, Lipofectamine™ und Polyfect®, benutzt. Die Transfektionseffizienzen von beiden Systemen wurde ermittelt. Lipofectamine™ zeigte eine Effizienz von 60 ± 11 % bei HeLa-Zellen und 31 ± 8 % bei MG-63-Zellen. Polyfect® zeigte eine Effizienz von 22 ± 6 % für HeLa- und 14 ± 3 % für MG-63-Zellen (Daten sind nicht gezeigt). Eine Besonderheit von Lipofectamine™ ist eine hohe Transfektionsrate und parallel eine niedrige Überlebensrate von mit Lipofectamine™ transfizierten Zellen (Abbildung 4.3.12). Für HeLa-Zellen und MG-63-Zellen lag die Vitalität bei Transfektion mit Lipofectamine™ zwischen 30 % und 50 %. Im Gegenzug zeigten die Calciumphosphat-Nanostäbchen keinen zytotoxischen Effekt.

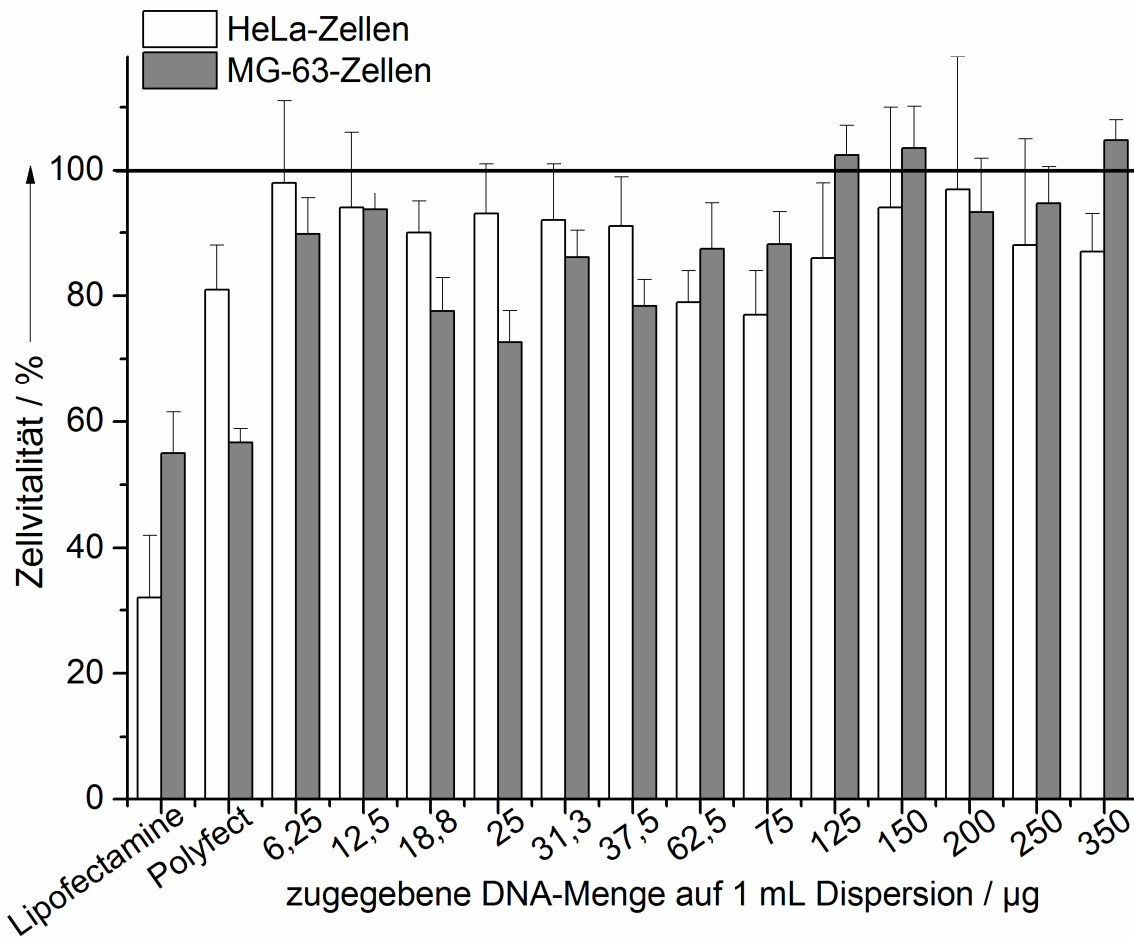


Abb. 4.3.12: Vitalität von HeLa- und MG-63-Zellen nach der Transfektion mit CaP/PEI-Nanostäbchen, die mit unterschiedlichen Mengen an pcDNA3-eGFP funktionalisiert wurden, sowie nach der Transfektion mit Polyfect® und Lipofectamine™. Die Vitalität der nichttransfizierten Zellen ist auf 100 % normiert.

Die Calciumphosphat/PEI/DNA-Nanostäbchen erzeugten bei den eingesetzten Konzentrationen von Calciumphosphat, PEI und DNA keine akute Zytotoxizität. Bei höheren DNA-Konzentrationen in Dispersion lag die Zellvitalität zwischen 80 % und 100 %. Eine Zellvitalität von etwa 80 % wurde für die MG-63-Zellen beobachtet, die dazu eine hohe Transfektionseffizienz zeigten. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Untersuchungen von Calciumphosphat-Nanopartikeln überein^[10, 190] und bestätigen eine niedrige Zytotoxizität der Calciumphosphat-Nanostäbchen trotz PEI.^[216]

4.3.3.2 Anti-eGFP-siRNA-funktionalisierte Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen

Für weitere Untersuchungen mit Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen wurden analog der DNA unterschiedliche Mengen an anti-eGFP-siRNA für die Funktionalisierung der Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen eingesetzt. Die Nanostäbchen wurden von Herrn Dr. Jan Klesing hergestellt und charakterisiert. Die Synthese der Calciumphosphat/PEI/siRNA-Nanopartikel wurde in Kapitel 3.2.4 beschrieben.^[8]

Die Charakterisierung der Nanostäbchen erfolgte mittels DLS.^[8] Das Zetapotential und der hydrodynamische Durchmesser sind in Abbildung 4.3.13 gezeigt.

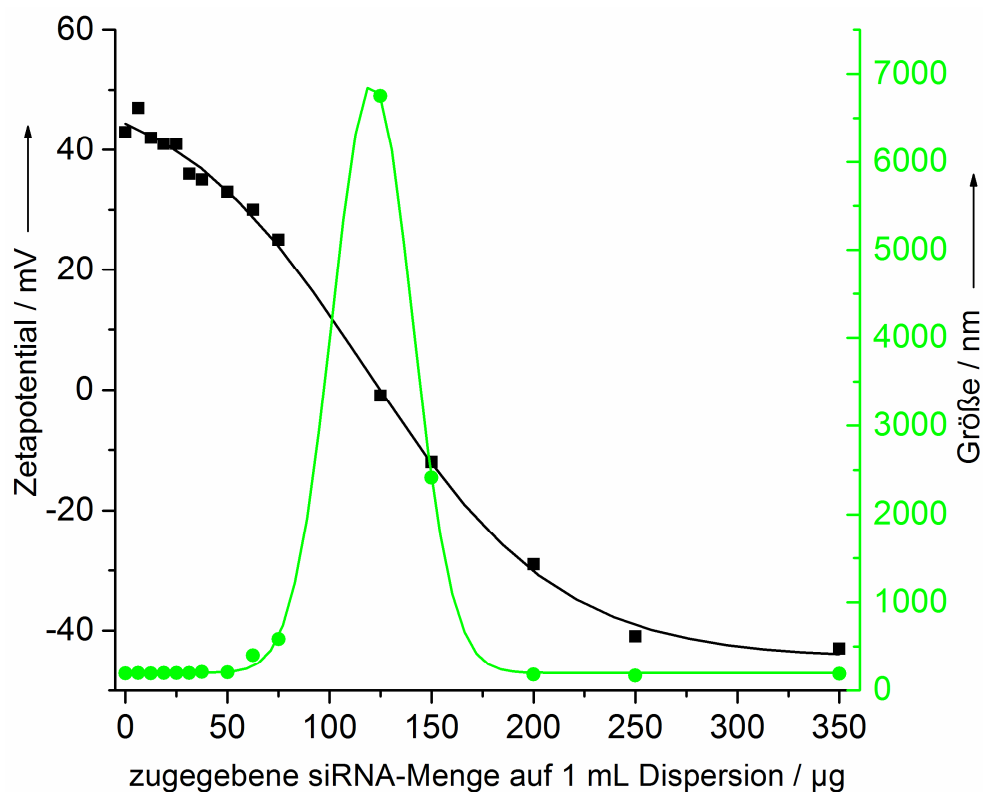


Abb. 4.3.13: Zetapotential und hydrodynamische Durchmesser der CaP/PEI-Nanostäbchen, die mit unterschiedlichen Mengen an siRNA beladen wurden.

Bei Erhöhung der siRNA-Konzentration im System wurden ähnliche Änderungen im Zetapotential und in der Größe der Nanostäbchen beobachtet wie nach der Zugabe von DNA. Das Zetapotential lag bei +45 mV bis etwa +30 mV, und der Durchmesser lag bei etwa 200 nm bei der Zugabe von 6,25 µg bis 50 µg siRNA. Eine Erhöhung der zugegebenen Menge siRNA führte zu Störungen in der kolloidalen Stabilität des Systems und infolgedessen zur Agglomeration der Nanostäbchen.

Eine vollständige Umladung des Systems zu einer negativen Oberflächenladung fand bei Zugabe von mindestens 200 µg siRNA statt. Das System war kolloidal stabil. Der Durchmesser lag bei etwa 200 nm, und das Zetapotential lag bei etwa -40 mV. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der DNA-beladenen und PEI-funktionalisierten Nanostäbchen überein.

Gen-Stummschaltungs-Experimente wurden an HeLa-eGFP-Zellen wie in Kapitel 3.5.7 beschrieben durchgeführt. Repräsentative fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen der HeLa-eGFP-Zellen nach Behandlung mit siRNA-beladenen Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen sind in Abbildung 4.3.14 gezeigt.

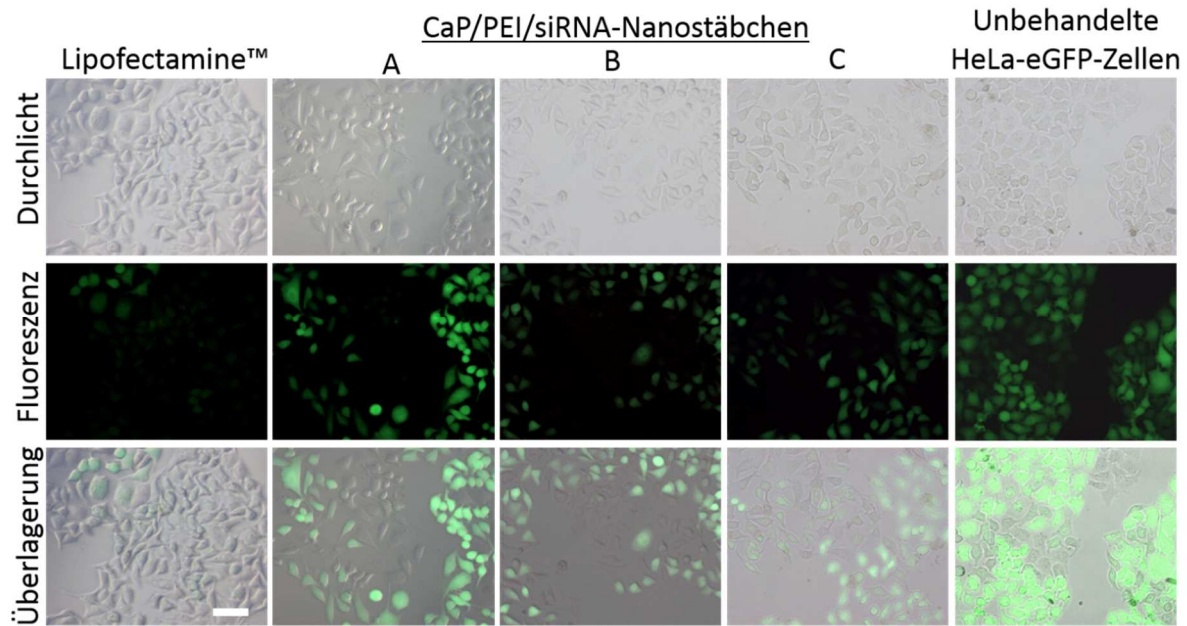


Abb. 4.3.14: Fluoreszenzmikroskopische und durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HeLa-eGFP-Zellen nach der Gen-Stummschaltung mit siRNA-funktionalisierten Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen aus dem „kationischen Bereich“ (A), dem „agglomerierten Bereich“ (B), dem „anionischen Bereich“ (C) sowie mit Lipofectamine™. Die Skala entspricht 50 μm .

Die mittels Fluoreszenzmikroskopie erhaltenen Daten wurden quantitativ ermittelt und in Form eines Diagramms zusammengefasst (Abbildung 4.3.15).

Als Kontrolle wurden die Zellen mit Lipofectamine™ gemäß dem Standard-Protokoll transfiziert. Die Gen-Stummschaltungs-Effizienz lag in diesem Fall bei etwa 90 %. Die Effizienz der Gen-Stummschaltung lag bei etwa 30 % bei den positiv geladenen Nanostäbchen. Die erhaltenen Ergebnisse sind mit den Untersuchungen von Sokolova *et al.* vergleichbar.^[182] Die agglomerierten Nanostäbchen zeigten eine Transfektionseffizienz von 10 – 20 %. Die Systeme mit negativen Zetapotential-Werten zeigte Effizienzen bis etwa 30 %. In diesem Fall könnte eine Erhöhung der Effizienz von freier, nicht an die Nanostäbchen gebundene siRNA stammen.^[182] Diese These wurde mithilfe einer Kontrolle widerlegt. Als Kontrolle diente siRNA-Lösung mit einer äquivalenten Menge, die dem System mit 350 μg siRNA-Konzentration entspricht (Daten sind nicht gezeigt).

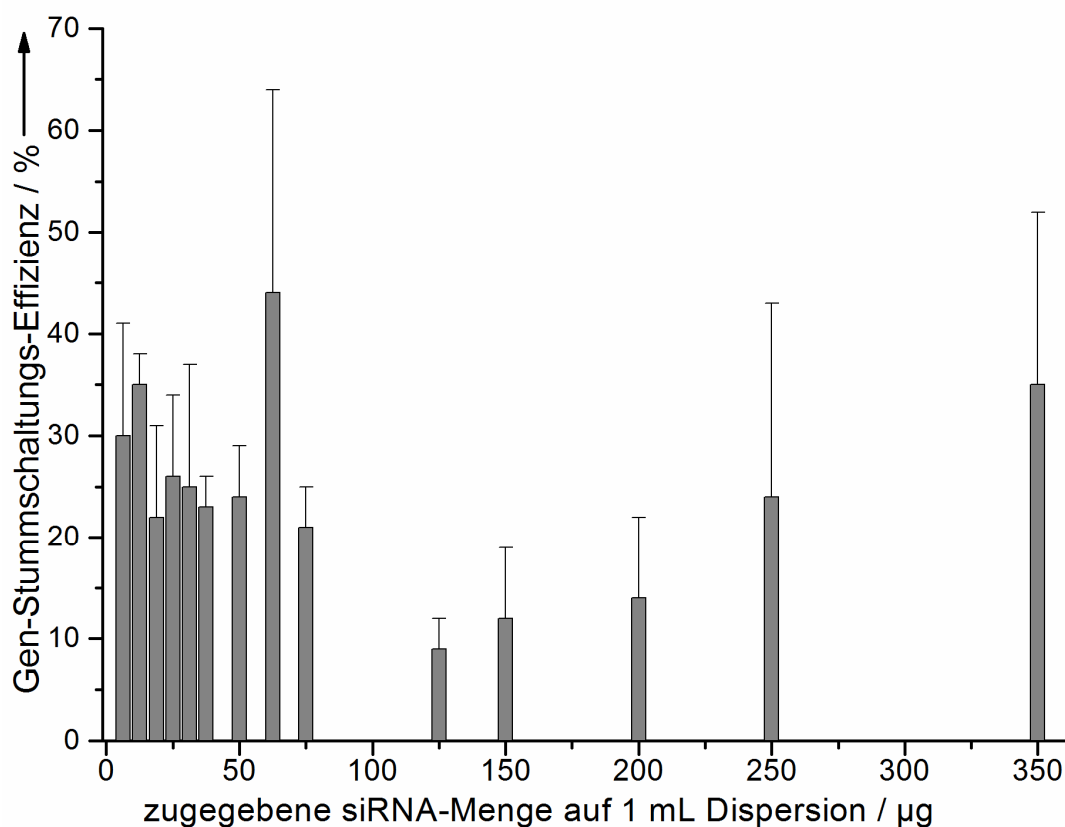


Abb. 4.3.15: Gen-Stummschaltungs-Effizienz von HeLa-eGFP-Zellen nach der Gen-Stummschaltung mit CaP/PEI-Nanostäbchen, die mit unterschiedlichen Mengen an siRNA beladen wurden.

Die beschriebenen Ergebnisse stimmen mit früheren Resultaten von Sokolova *et al.* bezüglich der Gen-Stummschaltung von negativ geladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln überein.^[182] Die Zellvitalität ist in Abbildung 4.3.16 gezeigt.

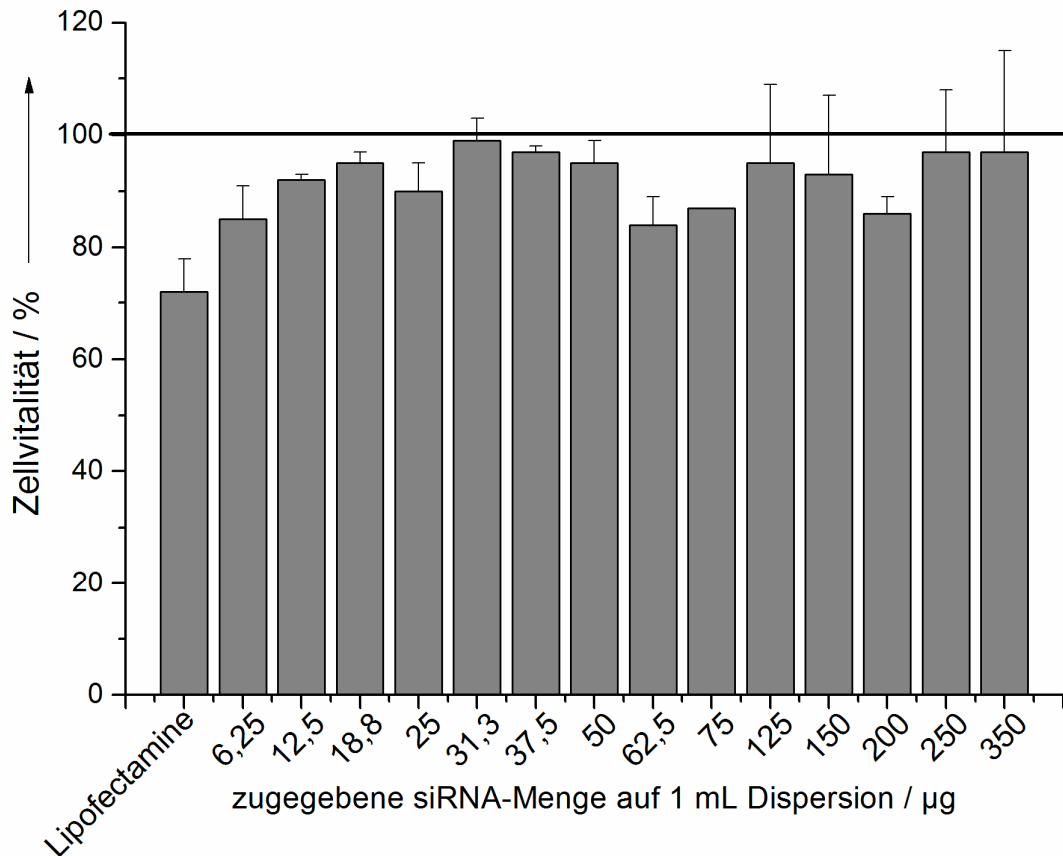


Abb. 4.3.16: Vitalität der HeLa-eGFP-Zellen nach der Gen-Stummschaltung mit CaP/PEI-Nanostäbchen, die mit unterschiedlichen Menge an siRNA-funktionalisiert wurden, sowie mit Lipofectamine™. Die Vitalität der nicht-transfizierten Zellen wurde auf 100 % normiert.

Es ist eine geringfügige zytotoxische Wirkung von Lipofectamine™ erkennbar. Die Vitalität der mit Lipofectamine™ behandelten Zellen lag bei 70 %. Für alle Arten von Nanostäbchen wurde eine Zellvitalität zwischen 80 % und 100 % ermittelt. Dies beweist eine gute Biokompatibilität von Calciumphosphat-Nanostäbchen bei der Gen-Stummschaltung *in vitro*.^[182, 190]

4.3.4 Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen, die mit einer äußeren Polyethylenimin-Schicht umgeladen wurden

Die Strategie des Umhüllens der an die Nanopartikel-Oberfläche adsorbierten DNA mit einer Polymer-Schicht, die auf dem Prinzip der Polyelektrolyt-Multischicht basiert, wurde erfolgreich bei der Herstellung der Calciumphosphat-Nanopartikel verwendet.^[10, 174] Die zusätzliche Calciumphosphat/DNA-Schicht in einer dreischaligen Struktur um die Nanopartikel nach Sokolova *et al.* schützt die DNA in der inneren Schicht vor Degradation durch Nukleasen.^[10, 174] Für die Herstellung der hier beschriebenen Nanostäbchen wurde ein ähnliches Verfahren verwendet.^[8] Auf die Oberfläche der Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen, die mit Plasmid negativ umgeladen wurden und ein negatives Zetapotential tragen, wurde Polyethylenimin adsorbiert, sodass das Zetapotential des Systems wiederum positiv wurde. Durch die positive Oberflächenladung werden diese Nanostäbchen gut von den Zellen aufgenommen, und das PEI als äußere Schicht schützt das Plasmid vor der Degradation durch lysomale Enzyme.^[126, 142] Die Nanostäbchen wurden von Herrn Dr. Jan Klesing hergestellt und charakterisiert. Die Daten der kolloidchemischen Charakterisierung der Nanostäbchen sind in Tabelle 4.3.3 dargestellt. Die Calciumphosphat-Konzentrationen wurden aus der Ausgangskonzentration ermittelt. Der hydrodynamischen Durchmesser war 190 nm, und das Zetapotential wurde mit +28 mV bestimmt. Die synthetisierten, positiv geladenen Nanostäbchen wurden in Zellexperimenten an HeLa-, HeLa-eGFP- und MG-63-Zellen getestet. Tabelle 4.3.4 fasst die Konzentrationen an Calciumphosphat, DNA (siRNA) und PEI im Zellmedium nach der Zugabe der Nanostäbchen zu den Zellen zusammen. Die PEI-Konzentration im Zellmedium wurde anhand der im letzten Schritt der Synthese zugegebenen PEI-Menge berechnet.

Tab. 4.3.3: Zusammensetzung und kolloidchemische Charakterisierung der Calciumphosphat/PEI/DNA(siRNA)/PEI-Nanostäbchen (die Daten in Klammern wurden bei Synthesen mit Modell-DNA erhalten).

Probe	Abkürzung	$c(\text{CaP}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{siRNA}) / \text{mg mL}^{-1}$	PDI	Durchmesser (DLS) / nm	ζ -Potential / mV
Calciumphosphat/PEI/DNA/PEI/-Nanostäbchen	CaP/PEI/DNA/PEI-NS	0,24	0,14	0	(0,15)	(190)	(+28)
Calciumphosphat/PEI/siRNA/PEI/-Nanostäbchen	CaP/PEI/siRNA/PEI-NS	0,27	0	0,15	(0,15)	(190)	(+28)

Tab. 4.3.4: Calciumphosphat-, DNA-, siRNA- und PEI-Konzentrationen pro mL Zellkulturmedium nach Zugabe der Calciumphosphat-Nanostäbchen zu den Zellen für die Transfektion.

Probe	Abkürzung	Probe pro Well / μL	$c(\text{CaP}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{siRNA}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{PEI}) / \mu\text{g mL}^{-1}$
Calciumphosphat/PEI/DNA/PEI/-Nanostäbchen	CaP/PEI/DNA/PEI-NS	37	17,8	10,7	0	7,9
Calciumphosphat/PEI/siRNA/PEI/-Nanostäbchen	CaP/PEI/siRNA/PEI-NS	37	19,9	0	11,2	8,9

Abbildung 4.3.17 zeigt typische Aufnahmen von transfizierten HeLa- und MG-63-Zellen.

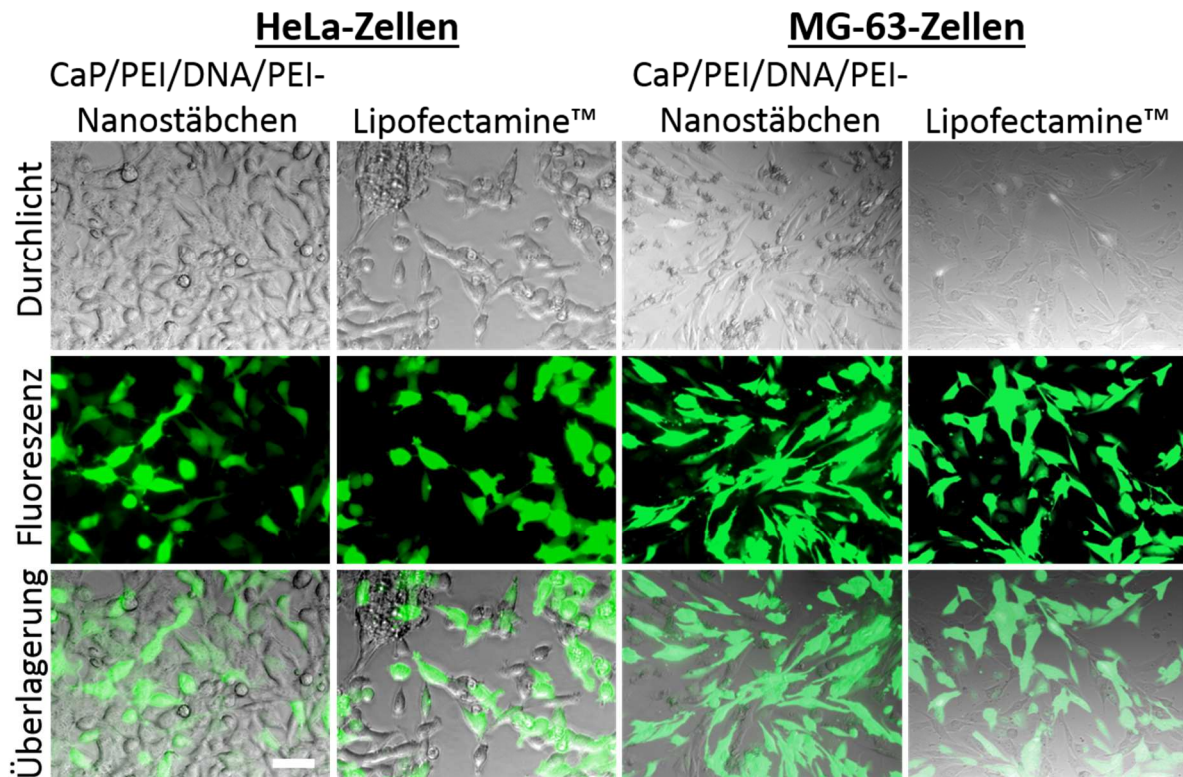


Abb. 4.3.17: Fluoreszenzmikroskopische, durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen und MG-63-Zellen nach der Transfektion mit PEI-beladenen und pcDNA3-eGFP-funktionalisierten Calciumphosphat/PEI-Nanostäbchen (CaP/PEI/DNA/PEI) und nach der Transfektion mit Lipofectamine™. Die Skala entspricht 50 µm.

Eine hohe Transfektionseffizienz des Systems zeigt sich in der grünen Fluoreszenz der Zellen durch eGFP bei beiden Zelllinien. Die Zellen, die mit Lipofetamine™ transfiziert wurden, zeigen eine ähnliche Effizienz. Die Auswertungen der erhaltenen Daten sind in Abbildung 4.3.19 dargestellt. Die Effizienz der Nanostäbchen lag bei etwa 50 %, was mit der Effizienz von Lipofectamine™ (60 %) vergleichbar ist. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Transfektion mit positiv geladenen Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln erhalten (Kapitel 4.1).^[10] Bei den dort beschriebenen

Untersuchungen lag die DNA-Konzentration bei 5 µg pro Well und ist mit den hier beschriebenen Konzentrationen vergleichbar.

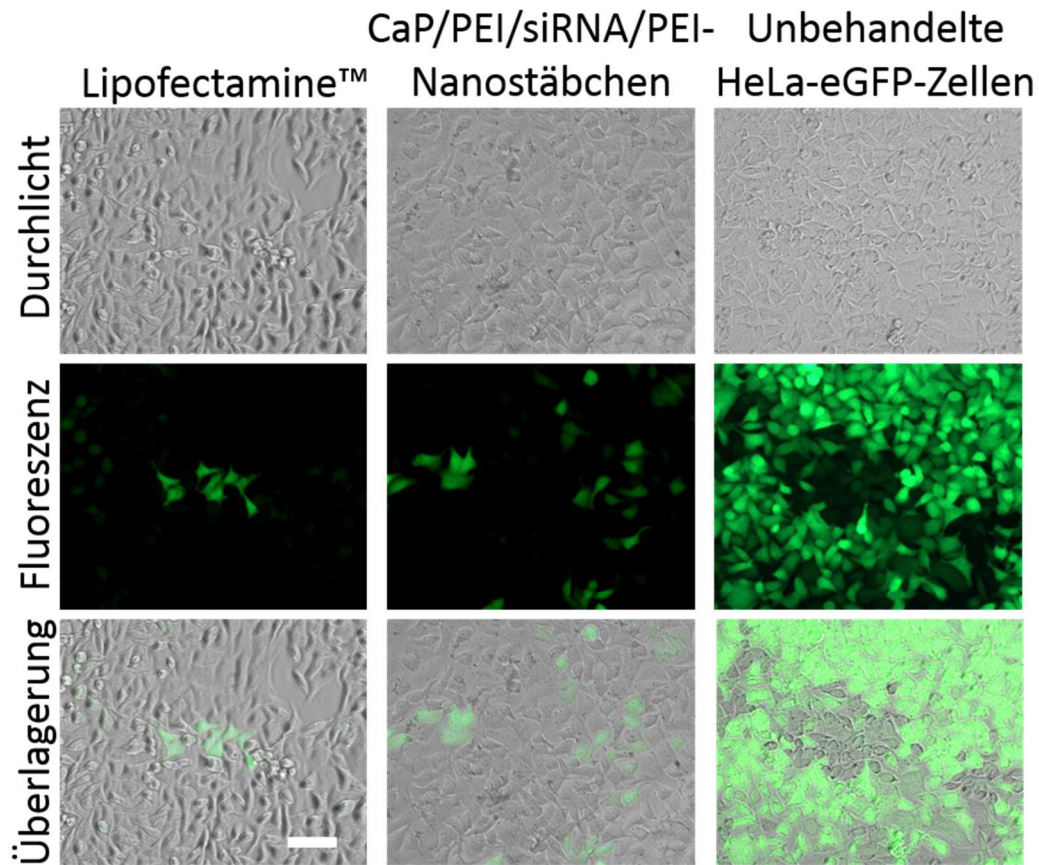


Abb. 4.3.18: Fluoreszenzmikroskopische und durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HeLa-eGFP-Zellen nach der Gen-Stummschaltung mit siRNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen (CaP/PEI/siRNA/PEI) sowie mit Lipofectamine™. Die Skala entspricht 50 µm.

Die Gen-Stummschaltungs-Experimente wurden mit siRNA-beladenen Nanostäbchen durchgeführt. Abbildung 4.3.18 stellt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen nach der Stummschaltung dar. Die Effizienz ist hoch und beträgt etwa 60 % (Abbildung 4.3.19). Dieser Wert ist signifikant niedriger als bei Lipofectamine™ (90 %), aber höher als bei anderen Systemen mit siRNA, die hier vorgestellt wurden, und mit den Ergebnissen der Stummschaltungs-Experimente mit dreischaligen Calciumphosphat/siRNA/Calciumphosphat/siRNA-Nanopartikeln (etwa 50 % Effizienz) vergleichbar.^[182]

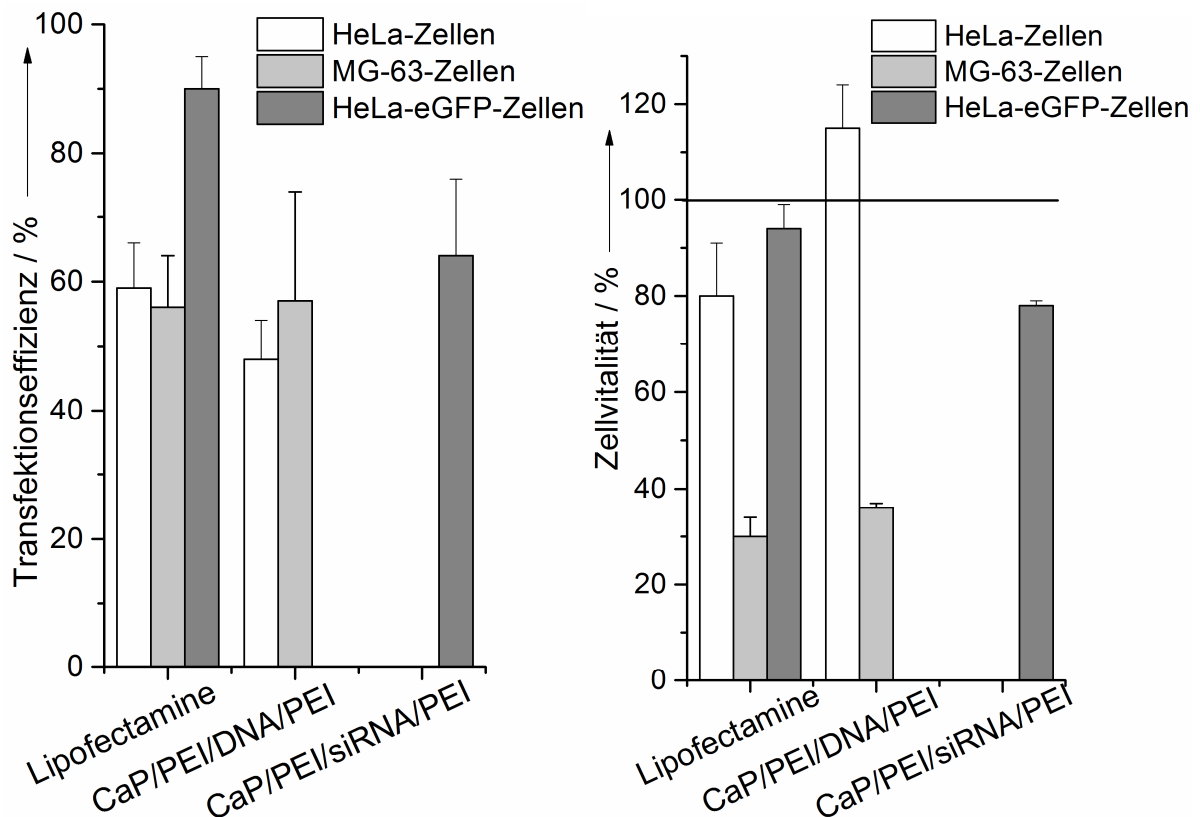


Abb. 4.3.19: Transfektionseffizienz und Gen-Stummschaltungs-Effizienz (links) und die Vitalität (rechts) von HeLa-, MG-63- und HeLa-eGFP-Zellen nach der Transfektion mit CaP/PEI/DNA(siRNA)/PEI-Nanostäbchen. Die Vitalität der nichttransfizierten Zellen wurde auf 100 % normiert.

Es ist anzumerken, dass die hergestellten Nanostäbchen nicht von freien Nukleinsäuren und PEI gereinigt wurden, und somit die Dispersionen PEI/DNA-Komplexe enthalten können. Die Untersuchungen des hier diskutierten Systems wurden von Herrn Rüsing weitergeführt.^[238] Es konnte keine wesentliche Rolle der Polyplexe in der Transfektionseffizienz des Systems gefunden werden. Dies stimmt weiterhin mit den Ergebnissen von Sokolova *et al.* überein.^[10] Die Ergebnisse der Zellvitalitätstests nach der Stummschaltung bzw. der Transfektion sind in Abbildung 4.3.19 gezeigt. Die Zellvitalität der mit Nanostäbchen transfizierten HeLa- und HeLa-eGFP-Zellen lag zwischen 80 % und 100 %. Allerdings zeigte der MTT-Test eine niedrige Vitalität der MG-63-Zellen (etwa 40 %). Die HeLa-Zellen zeigten eine ähnliche Effizienz, jedoch eine höhere

Vitalität als MG-63-Zellen. Die mit Lipofectamine™ transfizierten Zellen zeigten ähnliche Tendenzen. Die MG-63-Zellen waren empfindlicher als HeLa-Zellen. Bei den HeLa-eGFP-Zellen wurde eine Vitalität von etwa 80 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. J. Klesing erhalten.

4.3.5 Zusammenfassung

Es wurden Calciumphosphat-Nanostäbchen als Träger von Nukleinsäuren für die Transfektion und die Gen-Stummschaltung untersucht. Die Calciumphosphat-Nanostäbchen wurden mit DNA oder siRNA funktionalisiert, und die Oberflächenladung war negativ. Die beobachtete Transfektionseffizienz lag bei etwa 1 % aller Zellen und führte zu keiner Zytotoxizität. Eine hohe Effizienz zeigten die positiv geladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen, die mit PEI funktionalisiert wurden und zum Transport des Plasmids oder der siRNA in die Zellen benutzt wurden. Die nachfolgende Umladung der Nanostäbchen mit einer weiteren PEI-Schicht führte zu einer mit Lipofectamine™ vergleichbaren Effizienz und (für MG-63-Zellen) zur Toxizität. Für HeLa- und HeLa-eGFP-Zellen wurde nur ein geringer zytotoxischer Effekt der Nanostäbchen gefunden. Die durchgeführten *in-vitro*-Untersuchungen beweisen eine gute Transfektionseffizienz und eine im Allgemeinen hohe Biokompatibilität der Calciumphosphat-Nanostäbchen.

4.4 *In-vitro*-Untersuchungen der Calciumphosphat-Nanopartikel und Calciumphosphat-Nanostäbchen als Trägersystem für Nukleinsäuren in einer biologisch aktiven Knochenersatzpaste

4.4.1 Einführung in die Thematik

Aufgrund der guten Gewebeverträglichkeit und der chemischen Ähnlichkeit zum Knochen werden Calciumphosphate traditionell als Knochenersatzmaterialien verwendet.^[56, 59, 209-210, 214] Diese Materialien bestehen häufig aus einer Mischung verschiedener Calciumphosphate (z.B. Hydroxylapatit und amorphes Calciumphosphat), die mit einer Flüssigkeit zu einer Paste verarbeitet werden können.^[5, 213, 219, 221, 239-241] Calciumphosphate in Form einer Paste sind besonders gut zur Füllung von variabel geformten Knochendefekten geeignet.^[212] Die osteogene Potenz der Calciumphosphate könnte durch die Herstellung von Kompositen aus Calciumphosphat und einer osteoinduktiven Komponente (z.B. Proteine) gesteigert werden.^[242]

Zurzeit werden einige Wachstumsfaktoren mit osteogenen Eigenschaften erfolgreich in der Therapie von Knochendefekten verwendet.^[24-27, 29-30] Beispiele sind das *Bone morphogenetic protein* (BMP) und der *Vascular endothelial growth factor* (VEGF). Diese Faktoren wurden oft in Form eines rekombinanten Proteins klinisch eingesetzt.^[20, 22-23, 25, 28, 31] Um eine osteoinduktive Wirkung zu erhalten, soll eine physiologisch relevante Konzentration der Proteine an der Frakturstelle erreicht werden.^[19] Bei Verwendung der Proteine ist es ein zentrales Problem, dass sie schnell abgebaut werden und sich über die anliegenden Gewebe verteilen.^[21] Die Transfektion mit einer BMP- oder VEGF-kodierenden DNA kann eine relativ lange und lokale Proteinexpression im Implantatsbereich

Nanopartikeln funktionalisiert ist, wird in einen Knochendefekt eingeführt. Nach der Transfektion von den anliegenden Zellen durch die Nanopartikel sollen Knochenwachstumsfaktoren (BMP und VEGF) von den Zellen produziert werden. Dadurch soll das Knochenwachstum beeinflusst und die Regenerierung des Knochengewebes stimuliert werden.

Ein alternativer Weg zur Anwendung von DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln für die Heilung von Knochendefekts stellen *ex-vivo*-Anwendungen dar.^[17] In diesem Fall werden alle Manipulationen der Zellen außerhalb des Körpers *in vitro* durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist gegenüber *in-vivo*-Untersuchungen die Möglichkeit, die Zellen nach der Transfektion zu sortieren sowie auch eine ungewünschte Transfektion von anderen Zellen zu vermeiden.^[11] Nachteile dieser Methode sind unter anderem der hohe Zeitaufwand und das hohe Risiko von möglichen Kontaminationen und nachfolgende Infektionen.^[105]

Das Ziel dieses Teils der Arbeit ist es daher, an drei unterschiedlichen Zelllinien *in vitro* die Transfektion von Calciumphosphat-Nanopartikeln und Calciumphosphat-Nanostäbchen, die mit einer knochenwachstumsfaktoren-kodierenden DNA funktionalisiert sind, zu untersuchen.

4.4.2 Synthese und Charakterisierung

Es wurden DNA-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel und Calciumphosphat-Nanostäbchen dargestellt (Tabelle 4.3.1). Die Synthese und die Charakterisierung der Nanostäbchen wurden von Herrn Dr. Jan Klesing durchgeführt. Die Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel (Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,1)-Nanopartikel) wurde in Kapitel 3.2.6 beschrieben. Die Calciumphosphat-Nanostäbchen wurden auf Basis des Knochenersatzmaterials Ostim®, einem nanopartikulären phasenreinen Hydroxylapatit, hergestellt.^[96, 212]

Die Charakterisierung und die Synthese der Calciumphosphat-Nanostäbchen wurden in Kapitel 4.3 bzw. 3.2.6 beschrieben.

Für die Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel und Calciumphosphat-Nanostäbchen wurden BMP-7- und VEGF-A-kodierende DNA (BMP-7-pCMV6-XL4 und VEGF-A-pCMV6-XL5) verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde mittels ELISA im Zellmedium bestimmt. Die Zellvitalität wurde nach der Transfektion mittels MTT-Test überprüft.

Die hergestellten Nanopartikel haben entweder eine positive oder eine negative Ladung. Die Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel (CaP/DNA-NP) und die dreischaligen Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel (CaP/DNA/CaP/DNA-NP) sind durch DNA-Moleküle in der äußeren Schicht des Nanopartikels negativ geladen.^[174] Die PEI-funktionalisierten Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel (CaP/DNA/CaP/PEI-NP) und PEI-funktionalisierte dreischalige Calciumphosphat/DNA-Nanostäbchen (CaP/PEI/DNA/PEI-NS) haben durch das PEI in der äußeren Schicht eine positive Oberflächenladung. Die PEI-funktionalisierten Calciumphosphat/DNA-Nanostäbchen (CaP/PEI/DNA-NS) wurden in Kapitel 4.3 beschrieben. Diese Nanostäbchen besitzen eine positive Ladung, da sie nicht vollständig mit DNA umgeladen sind.

REM-Aufnahmen von sphärischen PEI-funktionalisierten Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln (CaP/DNA/CaP/PEI-NP) und stäbchenförmigen PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen (CaP/PEI-NS) sind in Abbildung 4.4.2 dargestellt.

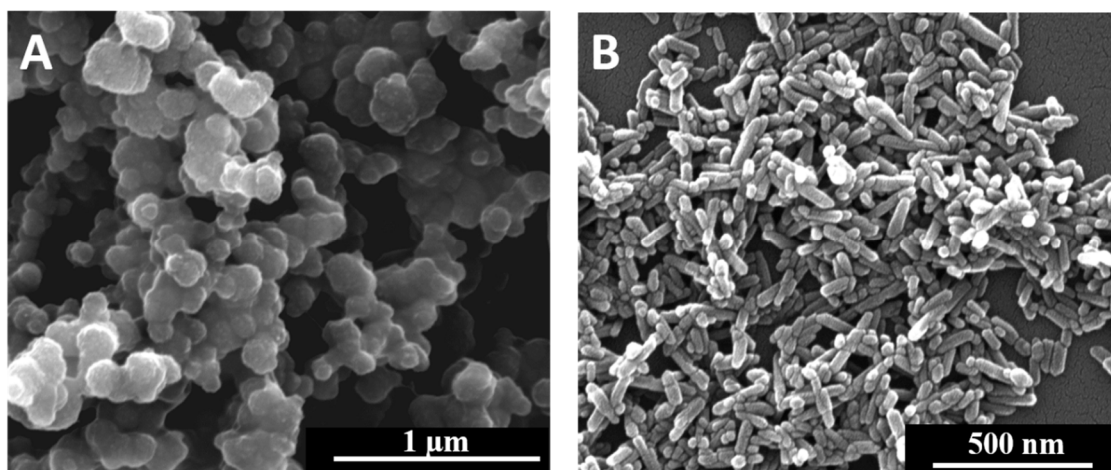


Abb. 4.4.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) PEI-funktionalisierten Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln (CaP/DNA/CaP/PEI-NP) und (B) PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen (CaP/PEI-NS).

Die Nanopartikel haben eine typische Größe von 100 nm. Die Nanostäbchen sind durchschnittlich etwa 100 nm lang und etwa 30 nm breit.

Die Zusammensetzungen der Calciumphosphat-Nanopartikel und der Calciumphosphat-Nanostäbchen sind in Tabelle 4.4.1 aufgeführt.

Tab. 4.4.1: Zusammensetzung der Calciumphosphat-Nanopartikel und Calciumphosphat-Nanostäbchen. Die Konzentrationen sind pro mL Nanopartikel- bzw. Nanostäbchen-Dispersion angegeben.

Probe	Abkürzung	Ladung	$c(\text{CaP}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{PEI}) / \text{mg mL}^{-1}$	DNA pro Well / μg
Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel	CaP/DNA-NP	negativ	0,26	0,17	-	6,2
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/DNA-NP	negativ	0,26	0,17	-	6,2
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI-NP	positiv	0,27	0,09	0,09	3,2
Calciumphosphat/PEI/DNA-Nanostäbchen	CaP/PEI/DNA-NS	positiv	0,29	0,02	0,02	0,9
Calciumphosphat/PEI/DNA/PEI-Nanostäbchen	CaP/PEI/DNA/PEI-NS	positiv	0,24	0,14	0,12	5,4
Lipofectamine™	Lipofectamine™	-	-	-	-	1,0

4.4.3 Transfektion von Zellen

Die Experimente zur Transfektion wurden mit unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt. Es wurden HeLa-Zellen als Modell für epitheliale Zellen, und die Osteosarkomzelllinie MG-63 als Modell für Osteoblasten benutzt. Mesenchymale Stammzellen dienten als Modell für nicht differenzierte Zellen. In Abbildungen 4.4.3 und 4.4.4 sind die Ergebnisse der ELISA nach der Transfektion gezeigt.

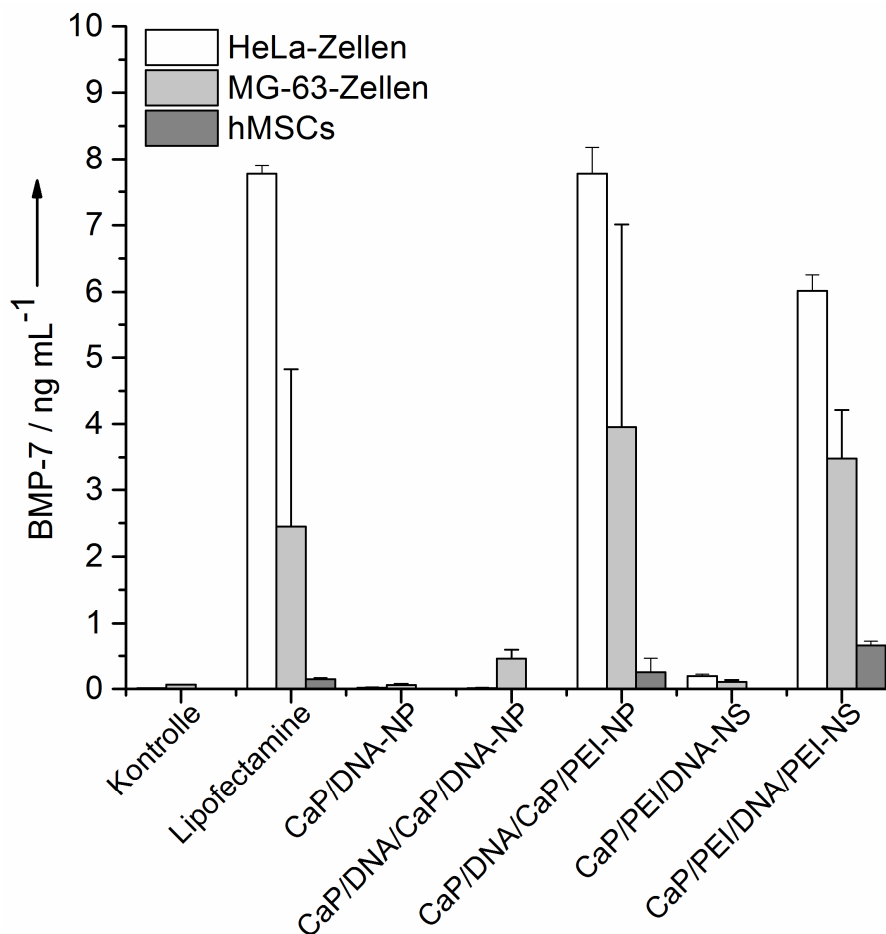


Abb. 4.4.3: Konzentration von BMP-7 in ng pro mL Zellmedium nach der Transfektion von HeLa-, MG-63- und humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) mit Calciumphosphat-Nanopartikeln (NP) und Calciumphosphat-Nanostäbchen (NS). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Bei der Transfektion mit allen Systemen, die mit BMP-7- oder VEGF-A-kodierender DNA funktionalisiert wurden, variierte die Konzentration des

Proteins im Zellmedium im Nanogramm-Bereich. Dabei führte die Transfektion mit negativ geladenen Nanopartikeln zu niedrigeren Proteinkonzentration als im Fall von positiv geladenen Nanopartikeln und Nanostäbchen.

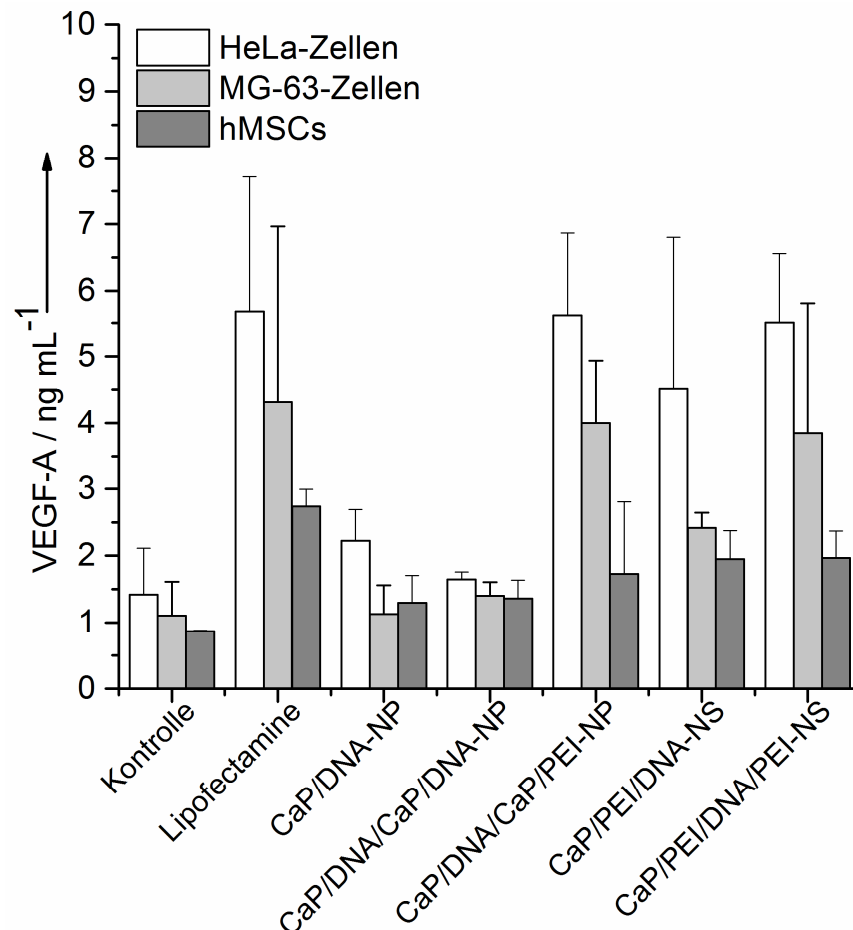


Abb. 4.4.4: Konzentration von VEGF-A in ng pro mL Zellmedium nach der Transfektion von HeLa-, MG-63- und humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) mit Calciumphosphat-Nanopartikeln (NP) und Calciumphosphat-Nanostäbchen (NS). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Die Proteinkonzentration lag für MG-63-Zellen bei der Transfektion mit negativ geladenen dreischaligen Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln (CaP/DNA/CaP/DNA-NPn) lag bei $0,5 \pm 0,1$ ng BMP-7 pro mL Zellmedium und bei der Transfektion mit positiv geladenen PEI-funktionalisierten Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln und Calciumphosphat-Nanostäbchen (CaP/DNA/CaP/PEI-NPn und CaP/PEI/CaP/DNA-NS) bei 4 ng BMP-7 pro mL Zellmedium.

Die PEI-funktionalisierten Calciumphosphat/DNA-Nanostäbchen (CaP/PEI/DNA-NS) zeigten trotz der positiven Ladung eine niedrige Transfektionseffizienz im Vergleich zu den anderen Systemen (Abbildung 4.4.3).

Die höchste Proteinkonzentration wurde im Zellmedium nach der Transfektion mit den positiv geladenen Nanopartikeln und Nanostäbchen gefunden. Für die positiv geladenen Calciumphosphat-Nanopartikel und Calciumphosphat-Nanostäbchen ist die BMP-7-Konzentration mit der Konzentration des Proteins bei der Transfektion mit Lipofectamine™ vergleichbar und lag z.B. für HeLa-Zellen bei 8 ng mL^{-1} Zellmedium. Die gleiche Tendenz ergab auch die Transfektion der Calciumphosphat-Nanopartikel und -Nanostäbchen, die mit einer VEGF-A-kodierenden DNA beladen wurden (Abbildung 4.3.4). Es ist anzumerken, dass das VEGF-A-Niveau für nichttransfizierte Kontrollzellen bei 1 ng mL^{-1} lag. Diese VEGF-Expression von Tumor-Zellen sowie von mesenchymalen Stammzellen wurde bereits in der Literatur beschrieben.^[64, 243-245]

Die Transfektion mit positiv geladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln und Calciumphosphat-Nanostäbchen führte zu einer Expression des Proteins bis zu 6 ng mL^{-1} Zellmedium (HeLa-Zellen). Diese Werte sind signifikant höher als bei der Kontrolle und mit Lipofectamine™ vergleichbar.

Die Transfektionseffizienz variierte je nach Zelllinie. Die leicht transfizierbare HeLa-Zelllinie zeigte für alle Systeme eine hohe Proteinkonzentration. Bei den schwierig zu transfizierenden mesenchymalen Stammzellen lag die Transfektionseffizienz immer noch bei 1-2 ng Protein pro mL Zellmedium. Diese Abhängigkeit kann mit den Zellzyklus-Phasen und mit der Intensität der Zellteilung erklärt werden.^[2] Die HeLa-Zellen teilen sich häufiger als andere Zelllinien, sodass mehr M-Phasen in der gleichen Zeit stattfinden.^[246-247]

Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Transfizierbarkeit in Abhängigkeit von den Phasen des Zellzyklus wurden bei unterschiedlichen viralen und nichtviralen Transfektionssystemen durchgeführt.^[86, 88, 90, 248-249] Es

wurde gezeigt, dass die Transfektion mit der Standard-Calciumphosphat-Methode in einer S-Phase des Zellzyklus besonders erfolgreich ist,^[86] sowie in der M-Phase, wenn der Abbau der Kernmembran Zugang zu dem Zellkern ermöglicht.^[85, 201] Für kationische Lipide wurde eine höhere Transfektionseffizienz für sowohl in eine G2- oder M-Phase-transfizierte Zellen, als auch in eine S-Phase-transfizierte Zellen gefunden.^[90, 249] Außerdem konnte ein Unterschied in der Transfektionseffizienz für verschiedene Zelllinien mit der Internalisierung bei der Partikelaufnahme erklärt werden, wie Douglas *et al.* in einem Beispiel mit Alginat-Chitosan Nanopartikeln zeigte.^[141]

In Veröffentlichungen wurde davon berichtet, dass nach der Transfektion der BMP- oder VEGF-kodierenden DNA mit viralen oder nichtviralen Systemen die Proteinkonzentration im Zellmedium im Nanogramm-Bereich liegt.^[64, 75, 243, 250-251] Das stimmt mit den hier gezeigten Ergebnissen überein. So berichteten Jiang *et al.* über die Transfektion einer BMP-2- und VEGF-A-kodierenden DNA mit einem lentiviralen System an mesenchymalen Stammzellen. Eine Woche nach der Transfektion lag die Proteinkonzentration bei 2 pg mL^{-1} Zellmedium.^[66] Die Fibroblasten wurden mit einem adenoviralen System transduziert. Die BMP-7-Konzentration lag nach 24 h bei 125 ng mL^{-1} Zellmedium.^[252] Perez *et al.* zeigten, dass die Proteinmenge nach einer 4-tägigen Transfektion mit einer BMP-7-kodierenden DNA aus einem Kollagen-Hydroxylapatit-Gerüst etwa $0,02 \text{ ng}$ Protein pro mg zelluläre DNA betrug.^[67]

Mehrere Untersuchungen bestätigen eine biologische Aktivität und eine osteogene Wirkung der osteogenen Proteine, die nach der Transfektion der Zellen mit entsprechender DNA produziert wurden.^[68, 73, 75, 109, 132, 215, 217, 253-254] So fanden Perez *et al.* eine erhöhte Zellproliferation nach der erfolgreichen Transfektion eines Kollagen-Hydroxylapatit-Gerüsts.^[67] Li *et al.* beobachteten *in vivo* eine Knochenbildung nach der adenoviralen Transduktion von der BMP-7-kodierenden DNA an mesenchymalen Stammzellen *in situ*.^[72] Krebs *et al.*

berichteten über Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit einer BMP-2-kodierenden DNA funktionalisiert wurden. Um das Knochenwachstum stimulieren zu können, wurden diese Nanopartikel in einem Alginat-Hydrogel eingebettet. Die MC3T3-E1-Zellen (osteoblastäre Maus-Zellen) wurden zu den Kompositen gegeben und danach subkutan *in vivo* appliziert. Die Ergebnisse bestätigen die Fähigkeit der MC3T3-E1-Zellen, ein Knochengewebe zu bilden.^[215]

4.4.4 Zellvitalität

Um die Biokompatibilität von Nanopartikeln und Nanostäbchen *in vitro* zu testen, wurden Zellvitalitätstests mit allen Systemen und allen Zellen durchgeführt. Die Abbildungen 4.4.5 und 4.4.6 zeigen die Ergebnisse des MTT-Tests.

Die HeLa-Zellen zeigten bei der Transfektion mit allen Nanosystemen eine hohe Überlebensrate. Allerdings lag die Zellvitalität nach der Transfektion mit Lipofectamine™ für alle Zelllinien stets unten 60 %.

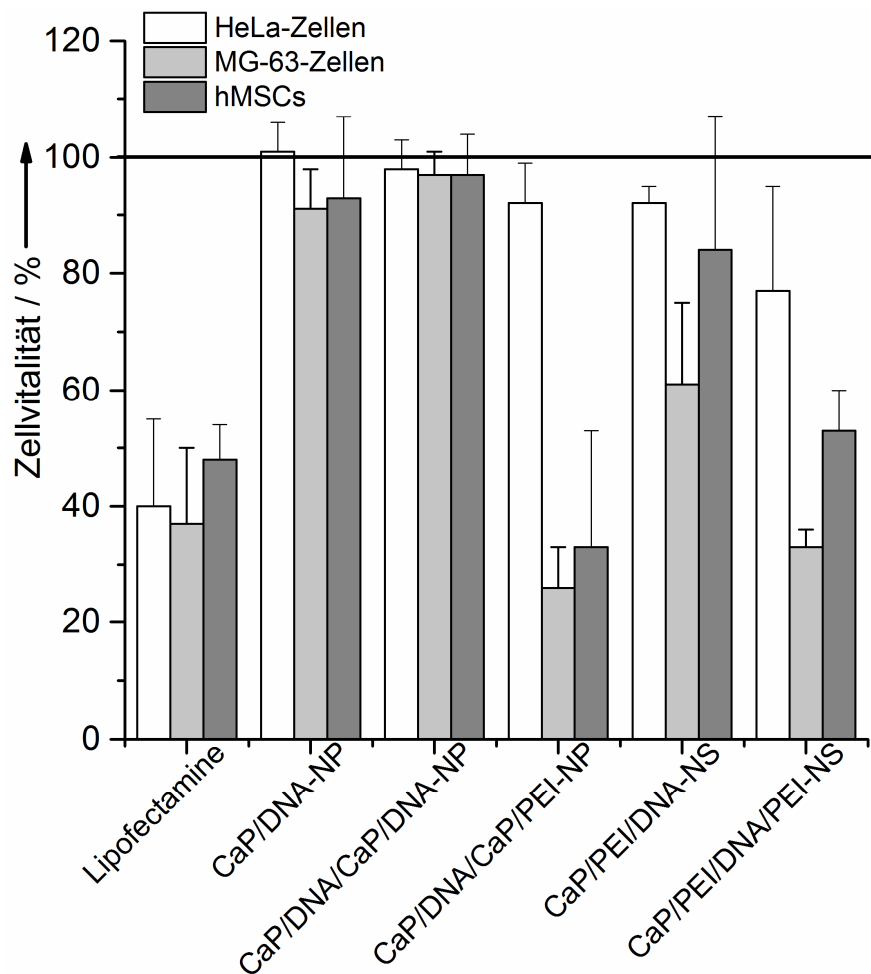


Abb.4.4.5: Vitalität von HeLa-, MG-63- und humanen mesenchymalen Stammzellen nach der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln (NP) und Calciumphosphat-Nanostäbchen (NS), die mit BMP-7-kodierender DNA funktionalisiert wurden. Die Vitalität der nichttransfizierten Kontrollzellen wurde auf 100 % normiert.

Eine signifikante Absenkung in der Zellvitalität konnte für die empfindlichen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden.

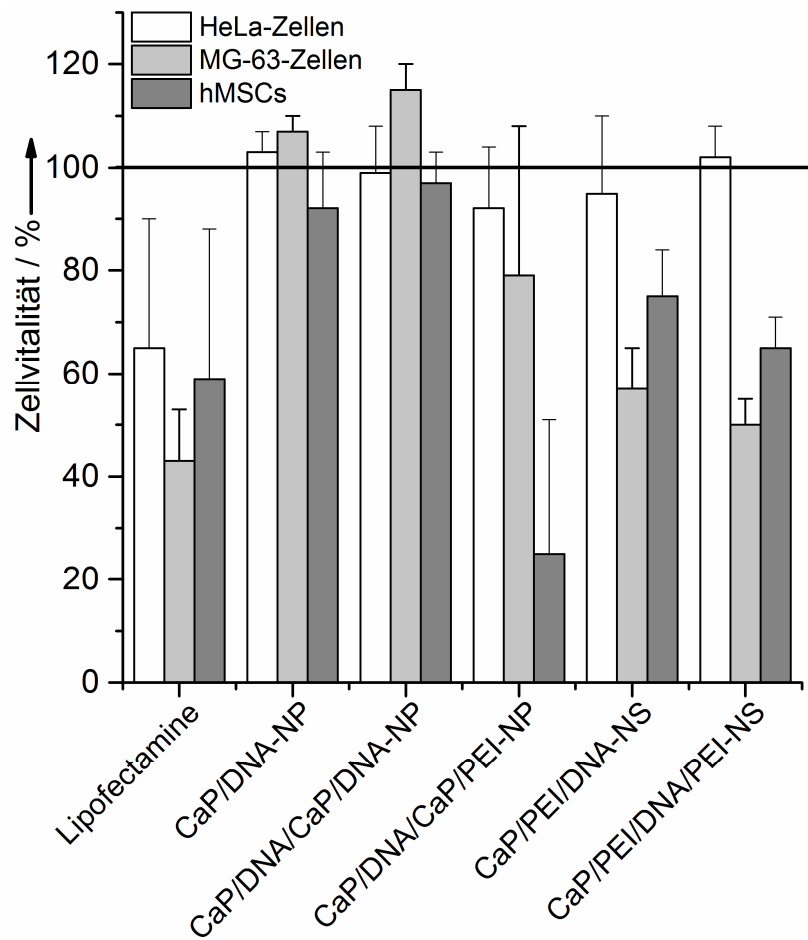


Abb. 4.4.6: Vitalität von HeLa-, MG-63- und humanen mesenchymalen Stammzellen nach der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln (NP) und Calciumphosphat-Nanostäbchen (NS), die mit VEGF-A-kodierender DNA funktionalisiert wurden. Die Vitalität von nichttransfizierten Kontrollzellen wurde auf 100 % normiert.

Nach der Transfektion von MG-63-Zellen und hMSCs mit den PEI-enthaltenden Nanopartikeln und Nanostäbchen lag die Zellvitalität nicht höher als 80 %. Diese Ergebnisse stimmen mit früher erhaltenen Daten überein.^[8, 10] Eine erhöhte Transfektionseffizienz für PEI-funktionalisierte Nanopartikel und Nanostäbchen kann oft durch eine erhöhte Zytotoxizität begleitet werden.^[8, 10]

4.4.5 Kotransfektion von BMP- und VEGF-kodierenden Plasmiden

In der Literatur wird ein möglicher gegenseitiger Einfluss der Proteine BMP und VEGF nach der Kotransfektion diskutiert. So fand Akiyama *et al.*, dass BMP-7 die Expression von VEGF in den Zellen induzieren kann.^[255] Die BMP-VEGF-kodierende DNA wurde mittels adeno-assoziierten viralen Vektoren auf mesenchymale Stammzellen (Knochenmark) *in vitro* und in Experimenten mit Kaninchen *in vivo* von Zhang *et al.* angewendet. Eine Stimulierung der Angiogenese und eine Regenerierung des Knochens wurden beobachtet.^[73] Allerdings zeigte Lin *et al.*, dass die lentivirale Kotransfektion von BMP-7- und VEGF-A-kodierender DNA an mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zur Transfektion von BMP-2-kodierender DNA zu einer Inhibition der osteogenen Wirkung des BMPs führt.^[253] Um die BMP-7- und VEGF-A-Expression nach der Kotransfektion *in vitro* zu untersuchen, wurden Calciumphosphat-Nanopartikel hergestellt, die entweder nur mit der BMP-7- oder der VEGF-A-kodierenden DNA, oder mit einer Mischung beider DNAs funktionalisiert wurden. Die Zusammensetzung der Calciumphosphat-Nanopartikel für die Kotransfektions-Experimente ist in Tabelle 4.4.2 dargestellt. Eine Mischung, die nur aus einer Art von DNA-(BMP-7-Plasmid oder VEGF-A-Plasmid)-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln besteht, wurde als eine weitere Variante der Kotransfektion untersucht.

Tab. 4.4.2: Zusammensetzung der Calciumphosphat-Nanopartikel für die Kotransfektion.

System für die Transfektion	Abkürzung	Art des Plasmids für die Transfektion	$c(\text{DNA})$ pro Well / $\mu\text{g mL}^{-1}$
Calciumphosphat/DNA/ Calciumphosphat/PEI- Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI-NP	BMP-7	5
		VEGF-A	5
		Mischung (1:1) von BMP-7- und VEGF-A-DNA	4,6 4,6
		Mischung (1:1) der NP mit BMP-7-DNA und der NP mit VEGF-A-DNA	4,6 4,6
Lipofectamine™	Lipofectamine™	BMP-7	2
		VEGF-A	2
		Mischung (1:1) von BMP-7- und VEGF-A-DNA	2 2

Die Transfektionsergebnisse sind in Abbildung 4.4.7 dargestellt. Es wurden keine gegenseitigen Effekte der Proteine bei der Kotransfektion gefunden.

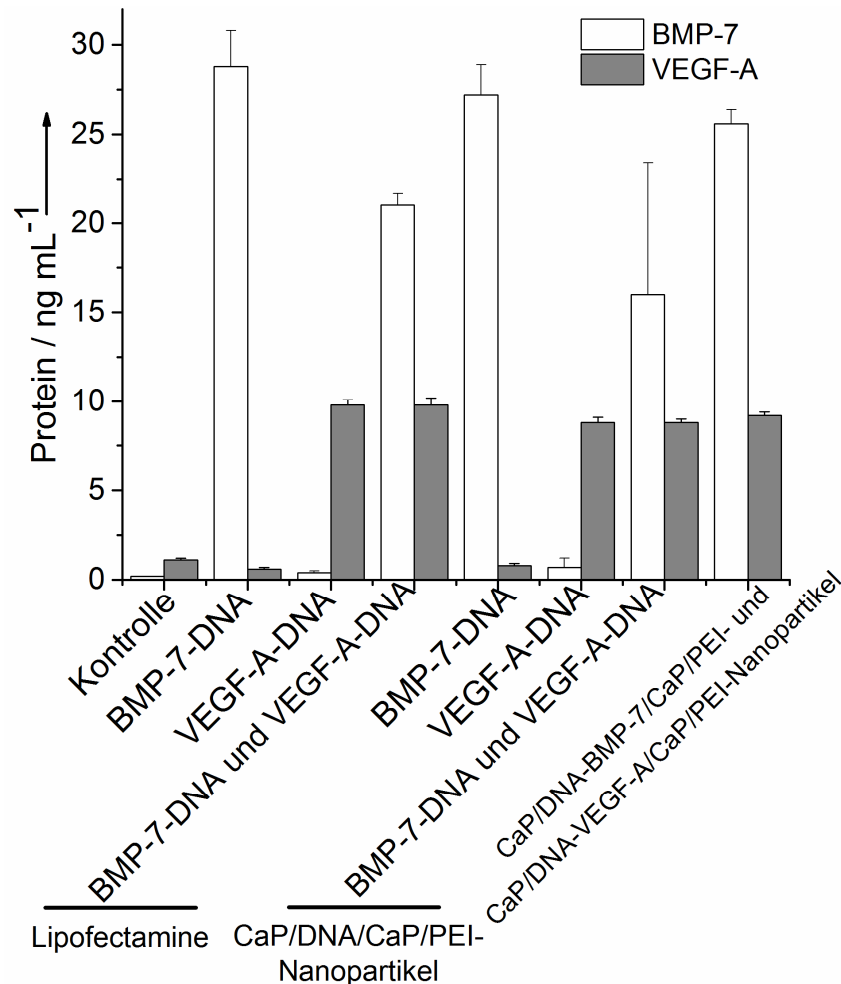


Abb. 4.4.7: Konzentration von VEGF-A und BMP-7 für HeLa-Zellen in ng pro mL Zellmedium nach der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln, die mit VEGF-A- und/oder BMP-7-kodierender DNA funktionalisiert wurden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Die BMP-7-Konzentration lag nach einer 72-stündigen Transfektion mit den mit BMP-7-kodierenden-DNA funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln bei 30 ng mL⁻¹. Die gefundene VEGF-Konzentration betrug etwa 10 ng pro mL Zellmedium nach der Transfektion mit dem entsprechenden Plasmid. Die Effizienz der Calciumphosphat-Nanopartikel ist mit der Effizienz des Lipofectamine™ vergleichbar.

Um die Zellvitalität zu bestimmen wurden MTT-Tests durchgeführt. Die Zellvitalität lag nach der Transfektion mit den Calciumphosphat-Nanopartikeln bei 80 % und mehr. Bei der Transfektion mit Lipofectamine™ sind nur noch 60 bis 80 % der Zellen vital (Abb. 4.4.8).

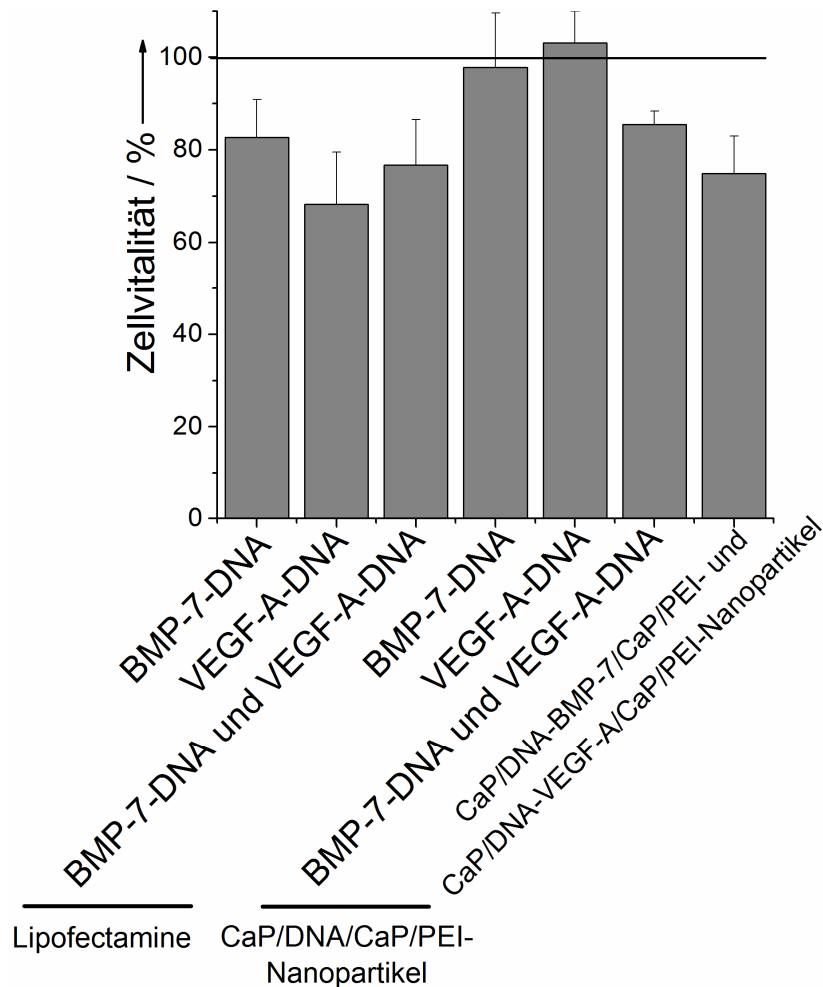


Abb. 4.4.8: Vitalität von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln, die mit BMP-7- und/oder VEGF-A-kodierender DNA funktionalisiert wurden. Die Vitalität von nichttransfizierten Kontrollzellen wurde auf 100 % normiert.

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Produktion von BMP sowie VEGF. Infolgedessen sind die Voraussetzungen für die Anwendung der Calciumphosphat-Nanopartikel und -Nanostäbchen, die mit BMP- und VEGF-kodierenden Plasmiden funktionalisiert wurden, als biologisch aktiver

Komponente einer Knochenersatzpaste gegeben. Auf Basis der hier beschriebenen Nanostäbchen wurde eine Formulierung für eine injizierbare Paste entwickelt und in Tierexperimenten *in vivo* angewendet. Diese *in-vivo*-Untersuchungen wurden von Herrn Dr. J. Rüsing beschrieben.^[238] Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. J. Klesing und Frau N. Soklakova erhalten.

4.4.6 Zusammenfassung

Es wurden Calciumphosphat-Nanopartikel und Calciumphosphat-Nanostäbchen mit Knochenwachstumsfaktoren-kodierender DNA funktionalisiert und an drei unterschiedlichen Zelllinien transfiziert. Die Expression der spezifischen Proteine fand nach der Transfektion bei allen Zelllinien statt. Die Konzentration der Proteine lag im (ng mL⁻¹)-Bereich und erreichte dabei das physiologische Niveau. Die Kotransfektion mit VEGF- und BMP-kodierender DNA bei Beladung der Nanopartikel mit beiden DNAs sowie bei der Mischung von zwei Arten der Nanopartikel ergab keine Unterschiede in der Effizienz. Dabei zeigten die Nanopartikel und Nanostäbchen nur eine geringe Zytotoxizität, mit Ausnahme der PEI-beladenen Nanopartikel und Nanostäbchen. Eine hohe Transfektionseffizienz und eine gute Biokompatibilität der getesteten Systeme *in vitro* sind Voraussetzungen für die Anwendung dieser Calciumphosphat-Nanopartikel und -Nanostäbchen als biologisch aktive Komponenten in einer Knochenersatzpaste.

4.5 Calciumphosphat-Nanopartikel als Trägersystem für Defensin-kodierende DNA

4.5.1 Einführung in die Thematik

Implantat-assoziierte Infektionen stellen ein großes Problem dar.^[256-258] Um dieses Problem zu beseitigen, wurden unterschiedliche Strategien entwickelt und mehrere Knochenersatzmaterialien und Implantat-Beschichtungen mit antibakteriellen Eigenschaften untersucht.^[257-260] Als ein Bestandteil des Knochenersatzmaterials oder der antibakteriellen Beschichtung des Implantats wurden erfolgreich Antibiotika eingesetzt.^[240, 258] Eine weitere Strategie ist das Aufbringen von silberhaltigen Strukturen mit antibakteriellen Eigenschaften auf die Oberfläche eines Implantats oder die Verwendung von Silber (in metallischer oder nanopartikulärer Form) als Komponente des Implantats.^[261-262] Eine interessante und vielversprechende Richtung auf dem Weg zum „idealen“ Implantat stellt die Verwendung von natürlich vorkommenden kationischen Peptiden mit antibakteriellen Eigenschaften dar.^[263-265] Der Vorteil der antimikrobiellen Peptide (AMP) ist ein breites Wirkungsspektrum gegen Bakterien, wobei keine Ausbildung einer resistenten Mutation der Bakterien möglich ist.^[263, 265]

Ein weiterer Schritt ist die Verwendung des AMP-kodierenden Plasmids, um die Zellen zu transfizieren und einen antimikrobiellen Effekt als Resultat der Transfektion zu erreichen (Abbildung 4.5.1). Die in der Literatur beschriebenen *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen waren erfolgreich.^[266-270] Diese Strategie findet Anwendung im Bereich der Hautinfektionen und bei der Hautwunden-Therapie.^[106, 271-276]

Eine gute Transfektionseffizienz sowie die guten „biomimetischen“ Eigenschaften sind wesentliche Vorteile der Anwendung der Calciumphosphat-

Nanopartikel in den Bereichen der Knochenersatzmaterialien und der Gen-Therapie.^[10-11, 59, 166, 172, 174]

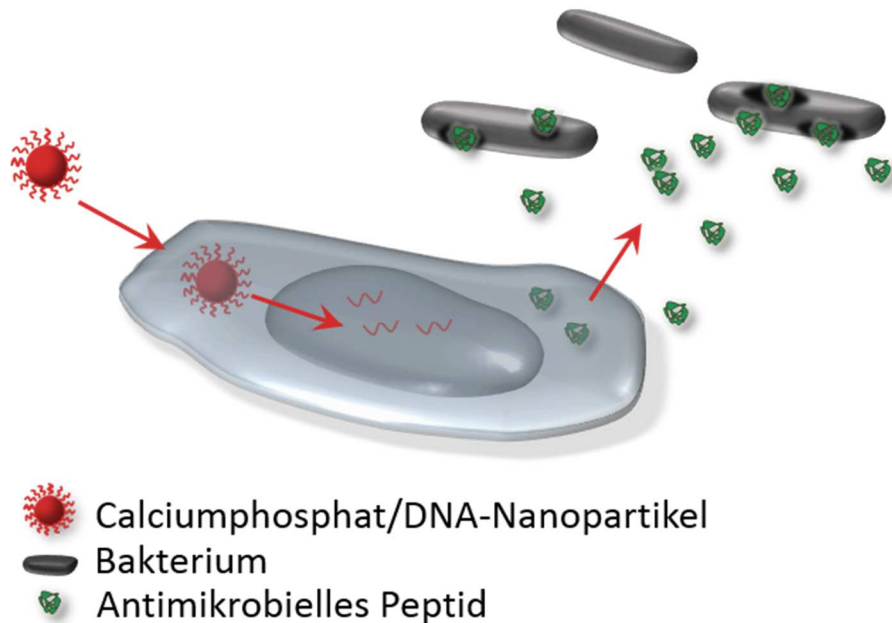


Abb. 4.5.1: Schematische Darstellung des Konzepts zum antibakteriellen Effekt der AMP-DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

In diesem Kapitel wird die Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln, die mit einer AMP (humanes beta-Defensin 3)-kodierenden DNA funktionalisiert sind, beschrieben.

4.5.2 Synthese und Charakterisierung

Die Synthese der DNA-funktionalisierten und PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurde nach dem Schema, das in Kapitel 3.2.7 beschrieben wurde, durchgeführt. Die hier beschriebenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mit hBD-3-pCMV6-AC-GFP ($c(\text{DNA}) = 1 \text{ g L}^{-1}$) funktionalisiert und mit unterschiedlichen Mengen an Polyethylenimin ($c(\text{PEI}) = 2 \text{ g L}^{-1}$; 2 000 Da) beladen. Aufgrund der sehr niedrigen Transfektions-effizienz der anderen Formulierungen der Calciumphosphat-Nanopartikel bei der

Transfektion mit dem Plasmid hBD-3-pCMV6-AC-GFP (nicht dargestellt) wurden die Calciumphosphat-Nanopartikel für die nachstehend beschriebenen Experimente mit PEI mit einer molekularen Masse von 2 000 Da funktionalisiert. Das PEI mit einer molekularen Masse von 2 000 Da ist weniger zytotoxisch als verzweigtes PEI mit 25 000 Da.^[134, 277] Die Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel erforderte in diesem Fall jedoch eine höhere Konzentration an PEI.

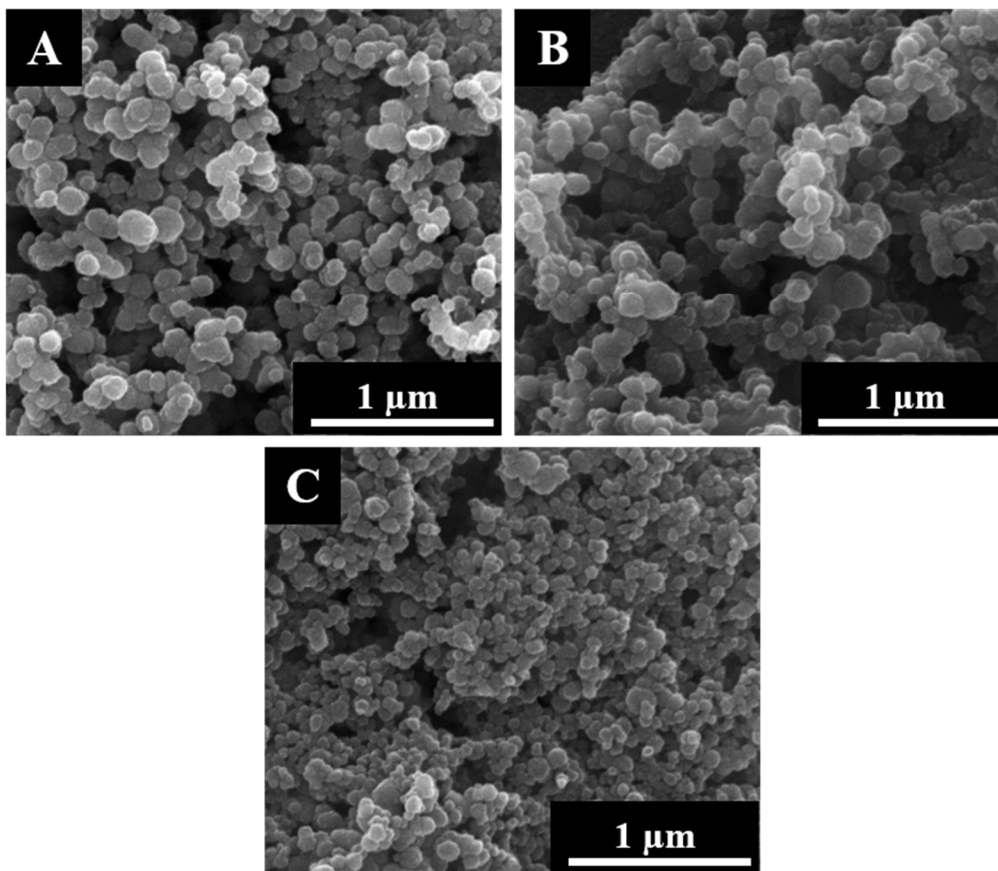


Abb. 4.5.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit hBD-3-GFP-kodierender DNA funktionalisiert wurden. **A)** CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)-Nanopartikel, **B)** CaP/DNA/CaP/PEI(1)-Nanopartikel, **C)** CaP/DNA/CaP/PEI(2)-Nanopartikel.

Um die Calciumphosphat-Nanopartikel zu synthetisieren, wurden unterschiedliche Mengen an Polymer verwendet. Es wurden Calciumphosphat-Nanopartikel mit einem Volumenanteil des PEI im Kolloid von 0,5 bis 2 hergestellt. Die Zusammensetzung der hergestellten Calciumphosphat-

Nanopartikel ist in Tabelle 4.5.1 gezeigt. Die Größe und die Ladung der Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mittels dynamischer Lichtstreuung und Rasterelektronenmikroskopie untersucht (Tabelle 4.5.1). Die mit Hilfe der DLS erhaltenen Daten zeigten eine hohe Polydispersität der Nanopartikel ($PDI = 0,4-0,6$) und ein positives ζ -Potential. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.5.2 zeigten die sphärische Morphologie der Nanopartikel und einen durchschnittlichen Durchmesser der Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI-Nanopartikel von ca. 100 nm.

4.5.3 Transfektion und Zellvitalitätstest

Die Transfektion von hBD-3-pCMV6-AC-GFP-funktionalisierten PEI-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurde mit HeLa-Zellen und MG-63-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Lipofectamine™ transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mit zwei Reportersystemen bestimmt. Das GFP-Reportergen diente als erster Reportersystem (mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar) und Defensin als zweites Reportersystem (quantitative Bestimmung mittels ELISA). Die Konzentrationen der Calciumphosphat-Nanopartikel, der DNA und des PEI im Zellmedium bei den Transfektionsuntersuchungen sind in Tabelle 4.5.2 zusammengefasst. Die Calciumphosphat-Nanopartikel wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Tab. 4.5.1: Zusammensetzung und kolloidchemische Charakterisierung der PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Probe	Abkürzung	$c(\text{CaP}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) / \text{mg mL}^{-1}$	$c(\text{PEI}) / \text{mg mL}^{-1}$	PDI	Durchmesser (REM) / nm	ζ -Potential / mV
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(0,5)-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)	0,23	0,07	0,37	0,5	104±29	22±3
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(1)-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI(1)	0,19	0,06	0,63	0,6	109±36	18±5
Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(2)-Nanopartikel	CaP/DNA/CaP/PEI(2)	0,15	0,05	0,95	0,4	77±23	10±4

Tab. 4.5.2: Calciumphosphat-, DNA- und PEI-Konzentrationen sowie die Partikelkonzentration pro mL Zellkulturmedium nach der Zugabe der Calciumphosphat-Nanopartikel oder der Polyplexe zu den Zellen für die Transfektion.

Probe	Probe pro Well / μL	$c(\text{CaP}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{DNA}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{PEI}) / \mu\text{g mL}^{-1}$	$c(\text{NP}) \cdot 10^{10} / \text{mL}^{-1}$
Calciumphosphat/DNA/ Calciumphosphat/PEI(0,5)- Nanopartikel	121	56	18	90	3,0
Calciumphosphat/DNA/ Calciumphosphat/PEI(1)- Nanopartikel	121	46	15	152	2,2
Calciumphosphat/DNA/ Calciumphosphat/PEI(2)- Nanopartikel	121	36	12	230	4,9
Polyplexe aus DNA/PEI(0,5)	121	-	18	90	-
Polyplexe aus DNA/PEI(1)	121	-	15	152	-
Polyplexe aus DNA/PEI(2)	121	-	12	230	-

Als Kontrolle wurden Polyplexe aus DNA und PEI hergestellt. Es ist anzumerken, dass die PEI-Konzentration pro Well sehr hoch (bis $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) war. Die Kontrollexperimente mit Polyplexen wurden durchgeführt, um den Beitrag des PEI in der Toxizität des Systems bei der Transfektion zu analysieren. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, wurde die Anzahl an grünfluoreszierenden Zellen gezählt und als deren Anteil an der gesamten Zellzahl berechnet (Kapitel 3.6.4). Abbildung 4.5.3 zeigt die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von HeLa- und MG-63-Zellen nach der Transfektion mit den hBD-3-pCMV6-AC-GFP-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die grünfluoreszierenden Zellen bestätigen die GFP-Gen-Expression des transfizierten Plasmids.

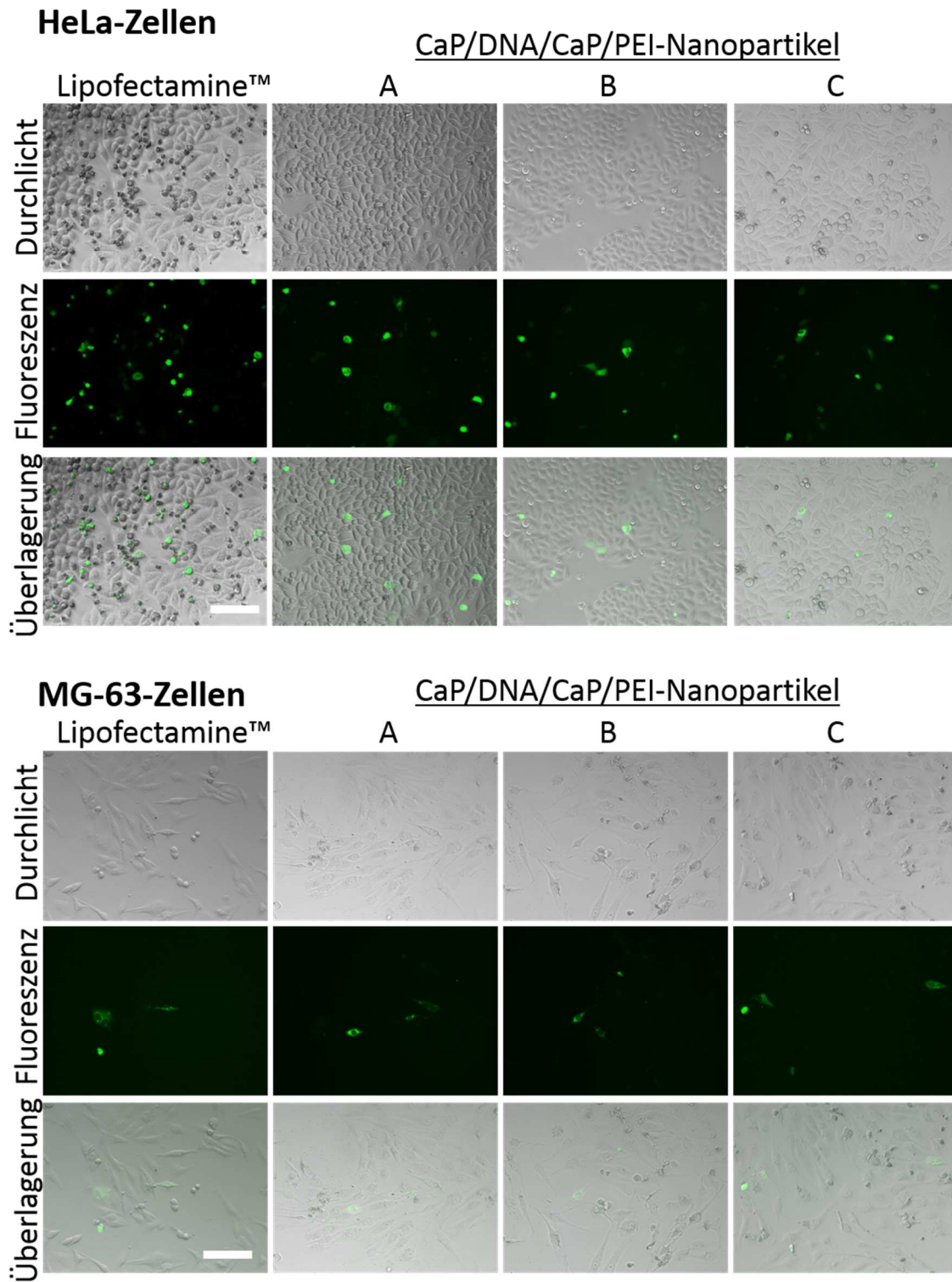


Abb. 4.5.3: Fluoreszenzmikroskopische und durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen und MG-63-Zellen nach der Transfektion mit hBD-3-pCMV6-AC-GFP-funktionalisierten CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)- (A), CaP/DNA/CaP/PEI(1)- (B), CaP/DNA/CaP/PEI(2)-Nanopartikeln (C) sowie mit Lipofectamine™. Die Skala entspricht 100 µm.

Die durch Mikroskopie erhaltenen Daten sind in Form eines Diagramms in Abbildung 4.5.4 gezeigt. Die maximale Transfektionseffizienz nach dem Reporter gen GFP ergaben die Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(1)-Nanopartikel und Lipofectamine™. Die Effizienz der Transfektion mit Calciumphosphat/DNA/Calciumphosphat/PEI(1)-Nanopartikeln an HeLa-Zellen lag bei 6 % und an MG-63-Zellen bei 10 %. Bei der Transfektion von Zellen mit Lipofectamine™ lagen die Werte bei 10 % für HeLa-Zellen und bei 6 % für MG-63-Zellen. Für alle weiteren getesteten Transfektionssysteme lagen die Effizienzen bei etwa 6 %. Die Kontrollexperimente mit den Polyplexen aus DNA und PEI zeigten weniger als 1 % Effizienz (nicht dargestellt) und deuten auf einen geringen Beitrag der Polyplexe in der Transfektionseffizienz des Systems hin.

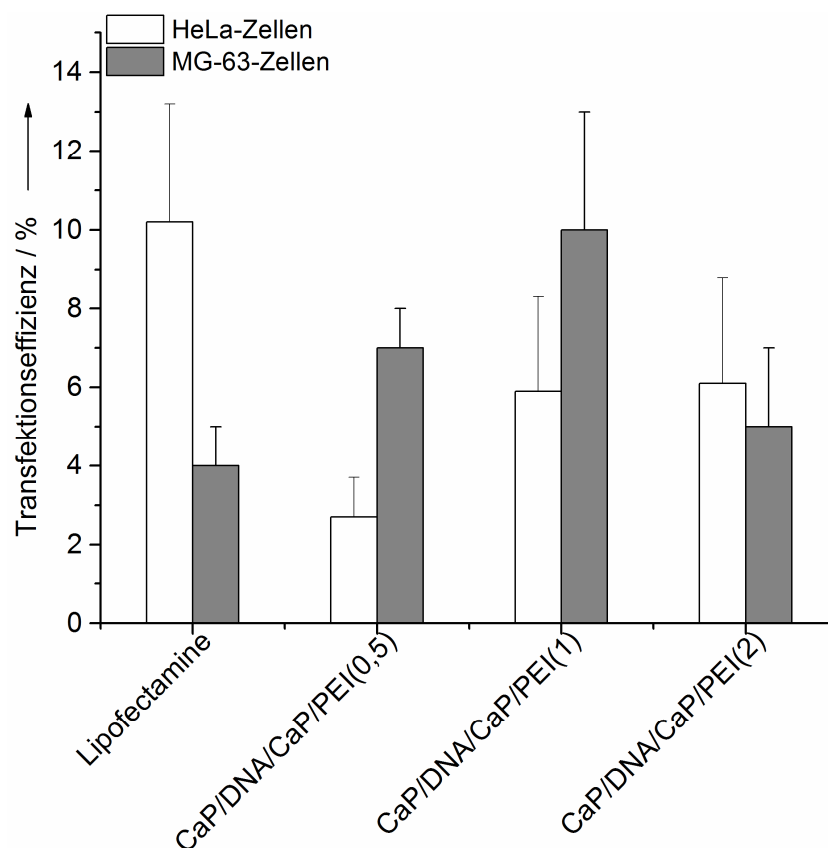


Abb. 4.5.4: Transfektionseffizienz entsprechend der GFP-Expression bei HeLa- und MG-63-Zellen nach der Transfektion mit Lipofectamine™, CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)-, CaP/DNA/CaP/PEI(1)- und CaP/DNA/CaP/PEI(2)-Nanopartikeln.

Um die hBD-3-Genexpression zu bestimmen, wurde ELISA mit dem Zellkulturmedium durchgeführt, das nach der Transfektion gesammelt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5.3 gezeigt.

Tab. 4.5.3: Konzentration von hBD-3 für HeLa- und MG-63-Zellen in pg pro mL Zellmedium nach der Transfektion mit hBD-3-kodierender-DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln sowie nach der Transfektion mit Lipofectamine™. Als Kontrolle wurden nichttransfizierte Zellen verwendet.

System	hBD-3-Konzentration / pg mL ⁻¹	
	HeLa-Zellen	MG-63-Zellen
Zellen (Kontrolle)	(<50)	(<50)
Lipofectamine™	1991 ± 1216	130 ± 6
CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)	567 ± 12	-
CaP/DNA/CaP/PEI(1)	666 ± 73	(<50)
CaP/DNA/CaP/PEI(2)	570 ± 98	-
DNAPEI(0,5)-Polyplexe	224	-
DNA/PEI(1)-Polyplexe	278 ± 31	-
DNA/PEI(2)-Polyplexe	293 ± 1	-

Die Ergebnisse des ELISA zeigen, dass die basale Konzentration von hBD-3 im Zellkulturmedium der Kontrollzellen unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die maximale Proteinkonzentration wurde nach der Transfektion mit kationischen Liposomen, Lipofectamine™, gefunden. Nach der Transfektion der HeLa-Zellen mit den Calciumphosphat-Nanopartikeln lag die hBD-3-Konzentration im Zellkulturmedium bei 0,6 ng mL⁻¹. Die MG-63-Zellen produzierten in allen Fällen maximal 0,1 ng mL⁻¹ Defensin. Diese Menge an produziertem Defensin ist signifikant höher als bei den Kontrollzellen, allerdings sehr niedrig im Vergleich zu den Daten in der Literatur.^[108, 268, 271, 274] Eine eindeutige antibakterielle

Wirkung gegen Gram-negative sowie Gram-positive Bakterien wurde bei hBD-3-Konzentrationen höheren als $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ gezeigt.^[278] Die hier beschriebenen Untersuchungen zeigen, dass die hBD-3-Konzentration im Zellmedium nach der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln etwa $0,6 \text{ ng mL}^{-1}$ erreichte, sodass keine antibakterielle Wirkung entfalten kann.

Um die Zellvitalität nach der Transfektion zu untersuchen, wurden MTT-Tests mit den transfizierten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5.5 dargestellt.

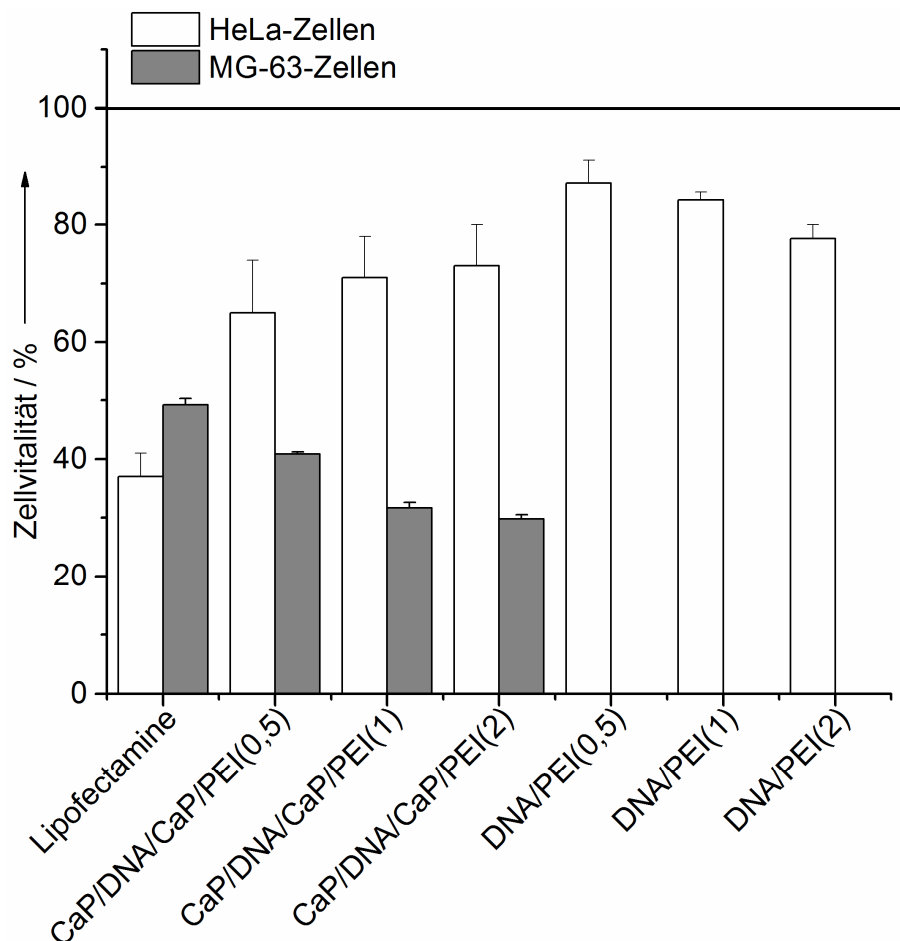


Abb. 4.5.5: Vitalität der HeLa- und MG-63-Zellen nach der Transfektion mit CaP/DNA/CaP/PEI(0,5)-, CaP/DNA/CaP/PEI(1)- und CaP/DNA/CaP/PEI(2)-Nanopartikeln sowie mit Polyplexen aus PEI/DNA und mit Lipofectamine™. Die Vitalität von nichttransfizierten Zellen auf 100 % gesetzt.

Die Vitalität der HeLa-Zellen nach der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln, Lipofectamine™ und Polyplexen lag unter 80 %, was auf eine zytotoxische Wirkung hindeutet. Die Vitalität der MG-63-Zellen lag bei ca. 40 %. Die niedrige Überlebensrate der Zellen könnte durch die PEI-Toxizität verursacht werden.^[10, 136, 277, 279-280] Das widerspricht jedoch den Daten, welche nach der Transfektion mit Polyplexen erhalten wurden, da die mit den Polyplexen behandelten HeLa-Zellen eine Vitalität von bis zu 80 % zeigten. Die Ursachen der beobachteten Zytotoxizität können kontrovers diskutiert werden. Die zytotoxische Wirkung von einigen humanen Defensinen an eukaryotischen Zellen wurde bereits beschrieben.^[281-284] Generell ist die Wirkung der Defensine Konzentrationsabhängig.^[285] So führte die Zugabe von 1 µM humanes Defensin (hBD-3) zu einer Stimulierung der Proliferation von Fibroblasten und epithelialen Zellen.^[286-287] Ein zytotoxischer Effekt wurde bei Konzentrationen oberhalb 5 µM für humanem beta-Defensin-1 und -2 beobachtet.^[287] Allerdings widerspricht dies mehreren Literatur-Daten, die keine Zytotoxizität der Defensine an eukaryotischen Zellen beschreiben.^[288-290]

Da für die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen humanes beta-Defensin-3-kodierendes Plasmid verwendet wurde, wurde eine Produktion von humanem beta-Defensin-3 erwartet. Die molare Masse von hBD-3 ist 5161,2 g mol⁻¹,^[278] was 0,39 nM von hBD-3 in Zellmedium nach der Transfektion mit Lipofectamine™ und 0,12 nM nach der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln entspricht. Diese Konzentrationen im Zellkulturmedium liegen deutlich unter der zytotoxischen Konzentration.^[287] In den verfügbaren Veröffentlichungen wurde keine eindeutige toxische Wirkung des hBD-3 auf eukaryotische Zellen bestätigt. Jedenfalls kann die beobachtete Zytotoxizität vom komplexen Einfluss des PEIs und des Defensins auf die Zelle verursacht werden.

4.5.4 Zusammenfassung

Calciumphosphat-Nanopartikel, die mit hBD-3-kodierender-DNA und PEI funktionalisiert wurden, besitzen eine positive Ladung und eine Größe von etwa 100 nm. Die Produktion von Defensin wurde im Zellkulturmedium nach der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Hilfe von ELISA nachgewiesen. Im Vergleich zu Lipofectamine™ sind die mit hBD-3-kodierender-DNA funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel weniger zytotoxisch für die Zellen. Allerdings liegt die Zellvitalität nach der Transfektion unter 80 %.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Calciumphosphat-Nanopartikel und Calciumphosphat-Nanostäbchen als Nukleinsäure-Träger für die Transfektion von eukaryotischen Zellen untersucht. Die Calciumphosphat-Nanopartikel wurden entweder mit Modellprotein-kodierenden Plasmiden (pcDNA3-eGFP, pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase) funktionalisiert oder mit Plasmiden beladen, die Proteine mit osteogenen (BMP-7) bzw. vaskularisierenden (VEGF-A) Eigenschaften oder ein Peptid mit antimikrobiellen Eigenschaften (hBD-3) kodieren. Die Gen-Stummschaltungsexperimente wurden an HeLa-eGFP-Zellen mit eGFP-siRNA durchgeführt.

Es wurde gezeigt, dass die Zugabe des positiv geladenen Polymers Polyethylenimin (PEI) zu den Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln zu einer hohen Transfektionseffizienz führte. Die positiv geladenen Calciumphosphat-Nanopartikel übertreffen die negativ geladenen Partikel in der Transfektionseffizienz. Trotz der Anwesenheit des potentiell zytotoxischen Polyethylenimins in den Kolloiden wurde nur eine begrenzte Zytotoxizität der Nanopartikel beobachtet.

Es wurde gezeigt, dass Nukleinsäure-beladene Calciumphosphat-Nanostäbchen lediglich eine niedrige Transfektions- und Gen-Stummschaltungseffizienz besitzen. Daher wurden die Calciumphosphat-Nanostäbchen mit PEI umgeladen und zum Transport des Plasmids oder der siRNA in die Zellen benutzt. Eine hohe Effizienz wurde sowohl bei der Transfektion als auch bei der Gen-Stummschaltung beobachtet. Die durchgeführten *in-vitro*-Untersuchungen beweisen eine gute Transfektionseffizienz und eine hohe Biokompatibilität der Calciumphosphat-Nanostäbchen.

Des Weiteren wurden *in-situ*-Beobachtungen von mit Calciumphosphat-Nanopartikeln transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der *time-lapse* Mikroskopie zeigen, dass die Transfektion und die Expression des

hineingetragenen Gens für aktiv teilende Zellen mit der Mitose verknüpft sind. Diese Beobachtungen können als mögliche Erklärung für die Abhängigkeit zwischen der Transfektionseffizienz der Calciumphosphat-Nanopartikel und dem Zelltyp dienen.

Weiterhin wurden die hBD-3-kodierender-DNA funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel hergestellt. Transfektion und die Zellvitalitätsuntersuchungen wurden durchgeführt. Die Produktion von Defensin konnte nach der Transfektion im Zellkulturmedium mit Hilfe von ELISA nachgewiesen werden. Allerdings wurde nach der Transfektion eine Zellvitalität von unter 80 % beobachtet.

Es wurde an unterschiedlichen Zelllinien (HeLa, MG-63, hMSC) *in-vitro*-Transfektionsuntersuchungen mit Calciumphosphat-Nanopartikel und -Nanostäbchen, die mit BMP-7- und VEGF-A-kodierender DNA funktionalisiert wurden, durchgeführt. Die Transfektion führte zur Produktion von BMP-7 und VEGF-A, was durch ELISA gezeigt werden konnte.

Calciumphosphate stellen die anorganische Komponente in humanen Hartgeweben (z.B. Knochen und Zähne) dar. Aufgrund ihrer guten Biokompatibilität werden Calciumphosphate daher als Knochenersatzmaterial in der Medizin verwendet. Die hier beschriebenen DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel und -Nanostäbchen stellen vielversprechende Kandidaten für die Anwendung in weiteren *in-vivo*-Experimenten in Tier-Modellen und im Bereich der biologisch aktiven Knochenersatzmaterialien dar.

6 Summary

In this thesis, the synthesis and characterization of calcium phosphate nanoparticles and nanorods as carriers of nucleic acids into eukaryotic cells are described. Nanoparticles and nanorods were tested in cell culture to assess their efficiency for transfection and gene silencing and a possible cytotoxicity. For that, the calcium phosphate nanoparticles and nanorods were functionalized with model plasmids (pcDNA3-eGFP, pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase), plasmids encoding antimicrobial peptide β -defensin, or encoding proteins which promote osteogenesis (BMP-7) or vasculogenesis (VEGF-A). Gene silencing experiments were carried out on HeLa-eGFP cells with eGFP-siRNA.

The addition of positively the charged polymer polyethyleneimine (PEI) to the nucleic acid-functionalized calcium phosphate nanoparticles increased the transfection efficiency, thus confirming that positively charged nanoparticles are more efficient comparing to negatively charged ones. Despite the potential cytotoxicity of polyethyleneimine, a low cytotoxicity of nanoparticles *in vitro* was observed.

It was also demonstrated that nucleic acid-loaded calcium phosphate nanorods alone possess low transfection and gene silencing efficiency *in vitro*. An additional functionalization of calcium phosphate nanorods with PEI increased the efficiency of both transfection and gene silencing. The subsequent nucleic acid/PEI functionalization led to a further increase of the transfection efficiency, comparable to that of commercially available reagent Lipofectamine™. Thus, the *in vitro* studies demonstrated a good transfection efficiency and generally a high biocompatibility of calcium phosphate nanorods.

Furthermore, the course of transfection with custom-made calcium phosphate nanoparticles was followed *in situ* by time-lapse microscopy. The results of the time-lapse microscopy show that for actively dividing cells, the transfection and

the gene expression are connected to mitosis. These observations may explain the differences in transfection efficiency between different cell types.

To assess future possible application of calcium phosphate nanoparticles, positively charged calcium phosphate nanoparticles were functionalized with plasmid encoding antimicrobial peptide human β -defensin (hBD-3) and tested their transfection efficiency and cytotoxicity were tested. The successful production of defensin was measured by ELISA in the cell culture supernatant after transfection. However, this transfection decreased the cell viability to 80%, compared to untreated cells.

Furthermore, *in vitro* experiments using different cell lines (HeLa, MG-63, hMSC) were carried out with both calcium phosphate nanoparticles and nanorods that have been functionalized with BMP-7- and VEGF-A-encoding DNA. The transfection led to the expression of BMP-7 and VEGF-A as quantified by ELISA. Calcium phosphates as a natural inorganic components of human hard tissue (e.g. bones and teeth) possess a good biocompatibility and a low cytotoxicity and have been already used as a bone substitution materials in medicine. In this work, further possible applications of calcium phosphate nanoparticles for successful additional genetic modification of surrounding tissues were described. The described DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles and nanorods showed a good transfection efficiency *in vitro* and are therefore promising candidates for *in vivo* experiments in animal models and as a component of biologically active bone graft substitutes.

7 Literaturverzeichnis

- [1] S. M. Dizaj, S. Jafari, A. Y. Khosroushahi, *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, 9, 9.
- [2] M. A. Mintzer, E. E. Simanek, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 259-302.
- [3] A. Kovtun, R. Heumann, M. Epple, *Biomed. Mater. Eng.* **2009**, 19, 241-247.
- [4] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1382-1395.
- [5] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3130-3146.
- [6] V. Sokolova, D. Kozlova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, *Acta Biomater.* **2013**, 9, 7527-7535.
- [7] S. Chernousova, J. Klesing, N. Soklakova, M. Epple, *Rsc Adv.* **2013**, 3, 11155-11161.
- [8] J. Klesing, S. Chernousova, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 199-204.
- [9] F. Zhao, Y. Zhao, Y. Liu, X. L. Chang, C. Y. Chen, Y. L. Zhao, *Small* **2011**, 7, 1322-1337.
- [10] V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Sci.* **2010**, 45, 4952-4957.
- [11] F. Wegman, F. C. Oner, W. J. Dhert, J. Alblas, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2013**, 29, 206-220.
- [12] P. Tarassoli, W. S. Khan, A. Hughes, N. Heidari, *Curr. Stem. Cell. Res. Ther.* **2013**, 8, 201-209.
- [13] M. J. Pensak, J. R. Lieberman, *Curr. Pharm. Des.* **2013**, 19, 3466-3473.
- [14] G. I. Im, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, 101, 3009-3018.
- [15] D. E. Wagner, S. B. Bhaduri, *Tissue Eng. Pt B-Rev.* **2012**, 18, 1-14.
- [16] A. Tautzenberger, A. Kovtun, A. Ignatius, *Int. J. Nanomed.* **2012**, 7, 4545-4557.
- [17] C. H. Evans, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2012**, 64, 1331-1340.
- [18] N. K. Bleich, I. Kallai, J. R. Lieberman, E. M. Schwarz, G. Pelled, D. Gazit, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 1320-1330.

- [19] C. H. Evans, *Expert. Rev. Mol. Med.* **2010**, 12, e18.
- [20] Y. Zhang, N. Cheng, R. Miron, B. Shi, X. Cheng, *Biomaterials* **2012**, 33, 6698-6708.
- [21] J. Fischer, A. Kolk, S. Wolfart, C. Pautke, P. H. Warnke, C. Plank, R. Smeets, *J. Craniomaxillofac. Surg.* **2011**, 39, 54-64.
- [22] S. N. Lissenberg-Thunnissen, D. J. J. de Gorter, C. F. M. Sier, I. B. Schipper, *Int. Orthop.* **2011**, 35, 1271-1280.
- [23] E. Wernike, M. O. Montjovent, Y. Liu, D. Wismeijer, E. B. Hunziker, K. A. Siebenrock, W. Hofstetter, F. M. Klenke, *Eur. Cells Mater.* **2010**, 19, 30-40.
- [24] T. Crouzier, K. Ren, C. Nicolas, C. Roy, C. Picart, *Small* **2009**, 5, 598-608.
- [25] H. Schliephake, H. A. Weich, C. Dullin, R. Gruber, S. Frahse, *Biomaterials* **2008**, 29, 103-110.
- [26] J. M. Kanczler, J. Barry, P. Ginty, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff, R. O. C. Oreffo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 352, 135-141.
- [27] A. Lode, C. Wolf-Brandstetter, A. Reinstorf, A. Bernhardt, U. Koenig, W. Pompe, M. Gelinsky, *J. Biomed. Mater. Res.* **2007**, 81A, 474-483.
- [28] R. Bilic, P. Simic, M. Jelic, R. Stern-Padovan, D. Dodig, H. P. van Meerdervoort, S. Martinovic, D. Ivankovic, M. Pecina, S. Vukicevic, *Int. Orthop.* **2006**, 30, 128-134.
- [29] D. W. Green, I. Leveque, D. Walsh, D. Howard, X. B. Yang, K. Partridge, S. Mann, R. O. C. Oreffo, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, 15, 917-923.
- [30] E. Smith, J. Yang, L. McGann, W. Sebald, H. Uludag, *Biomaterials* **2005**, 26, 7329-7338.
- [31] E. H. J. Groeneveld, E. H. Burger, *Eur. J. Endocrinol.* **2000**, 142, 9-21.
- [32] T. A. Brown, B. Jarosch, L. Seidler, *Genome und Gene: Lehrbuch der molekularen Genetik*, Spektrum Akademischer Verlag, **2007**.
- [33] D. F. Williams, *Biomaterials* **2014**, 35, 10009-10014.

- [34] D. F. Williams, *J. Biomed. Eng.* **1989**, *11*, 185-191.
- [35] D. F. Williams, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2941-2953.
- [36] A. R. Boccaccini, P. X. Ma, *Tissue engineering using ceramics and polymers*, Woodhead Publishing Limited, **2014**.
- [37] S. Sharifi, S. Behzadi, S. Laurent, M. L. Forrest, P. Stroeve, M. Mahmoudi, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2323-2343.
- [38] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, *Small* **2008**, *4*, 26-49.
- [39] J. G. Teeguarden, P. M. Hinderliter, G. Orr, B. D. Thrall, J. G. Pounds, *Toxicol. Sci.* **2007**, *95*, 300-312.
- [40] N. Asare, C. Instanes, W. J. Sandberg, M. Refsnes, P. Schwarze, M. Kruszewski, G. Brunborg, *Toxicology* **2012**, *291*, 65-72.
- [41] R. Foldbjerg, D. A. Dang, H. Autrup, *Arch. Toxicol.* **2011**, *85*, 743-750.
- [42] P. V. AshaRani, G. L. K. Mun, M. P. Hande, S. Valiyaveetil, *ACS Nano* **2009**, *3*, 279-290.
- [43] L. L. Hench, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *41*, 511-518.
- [44] R. Z. LeGeros, *Clin. Orthop. Rel. Res.* **2002**, *395*, 81-98.
- [45] B. G. X. Zhang, D. E. Myers, G. G. Wallace, M. Brandt, P. F. M. Choong, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 11878-11921.
- [46] A. F. Khan, M. Saleem, A. Afzal, A. Ali, A. Khan, A. R. Khan, *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *35*, 245-252.
- [47] M. Epple, K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann, V. Sokolova, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 18-23.
- [48] T. Miyazaki, K. Ishikawa, Y. Shirotsaki, C. Ohtsuki, *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 1670-1675.
- [49] J. R. Jones, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 4457-4486.
- [50] P. Nooeaid, V. Salih, J. P. Beier, A. R. Boccaccini, *J. Cell. Mol. Med.* **2012**, *16*, 2247-2270.
- [51] J. Hum, A. R. Boccaccini, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 2317-2333.

- [52] M. N. Rahaman, D. E. Day, B. Sonny Bal, Q. Fu, S. B. Jung, L. F. Bonewald, A. P. Tomsia, *Acta Biomater.* **2011**, 7, 2355-2373.
- [53] A. Kolk, C. Haczek, C. Koch, S. Vogt, M. Kullmer, C. Pautke, H. Deppe, C. Plank, *Biomaterials* **2011**, 32, 6850-6859.
- [54] C. Bergmann, M. Lindner, W. Zhang, K. Koczur, A. Kirsten, R. Telle, H. Fischer, *J. Eur. Ceram. Soc.* **2010**, 30, 2563-2567.
- [55] J. R. Porter, T. T. Ruckh, K. C. Popat, *Biotechnol. Prog.* **2009**, 25, 1539-1560.
- [56] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J. A. Planell, *J. R. Soc. Interface* **2008**, 5, 1137-1158.
- [57] R. Gupta, A. Kumar, *Biomed. Mater.* **2008**, 3, 034005.
- [58] P. Habibovic, K. de Groot, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, 1, 25-32.
- [59] M. Vallet-Regi, J. M. González-Calbet, *Progr. Solid State Chem.* **2004**, 32, 1-31.
- [60] L. L. Hench, J. M. Polak, *Science* **2002**, 295, 1014-1017.
- [61] L. L. Hench, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 81, 1705-1728.
- [62] W. P. Cao, L. L. Hench, *Ceram. Internat.* **1996**, 22, 493-507.
- [63] L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.* **1991**, 74, 1487-1510.
- [64] H. Mayer, H. Bertram, W. Lindenmaier, T. Korff, H. Weber, H. Weich, *J. Cell. Biochem.* **2005**, 95, 827-839.
- [65] C. H. Lu, Y. H. Chang, S. Y. Lin, K. C. Li, Y. C. Hu, *Biotechnol. Adv.* **2013**, 31, 1695-1706.
- [66] J. Jiang, C. Y. Fan, B. F. Zeng, *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12, 1744-1755.
- [67] R. A. Perez, M. P. Ginebra, M. Spector, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2011**, 22, 887-897.
- [68] F. Wegman, A. Bijenhof, L. Schuijff, F. C. Oner, W. J. A. Dhert, J. Alblas, *Eur. Cells Mater.* **2011**, 21, 230-242.

- [69] D. Yan, X. Wang, D. Li, Z. Qu, Q. Ruan, *Biotechnol. Lett.* **2011**, 33, 1751-1758.
- [70] M. Keeney, J. J. J. P. van den Beucken, P. M. van der Kraan, J. A. Jansen, A. Pandit, *Biomaterials* **2010**, 31, 2893-2902.
- [71] R. Li, C. H. Li, A. Nauth, M. D. McKee, E. H. Schemitsch, *J. Orthop. Trauma* **2010**, 24, 547-551.
- [72] J. Li, Y. Li, S. Ma, Y. Gao, Y. Zuo, J. Hu, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, 95A, 973-981.
- [73] C. Zhang, K. Z. Wang, H. Qiang, Y. L. Tang, Q. A. Li, M. A. Li, X. Q. Dang, *Acta Pharmacol. Sin.* **2010**, 31, 821-830.
- [74] Y. Hu, K. Cai, Z. Luo, R. Zhang, L. Yang, L. Deng, K. D. Jandt, *Biomaterials* **2009**, 30, 3626-3635.
- [75] M. Samee, S. Kasugai, H. Kondo, K. Ohya, H. Shimokawa, S. Kuroda, *J. Pharmacol. Sci.* **2008**, 108, 18-31.
- [76] R. T. Franceschi, S. Yang, R. B. Rutherford, P. H. Krebsbach, M. Zhao, D. Wang, *Cells, tissues, organs* **2004**, 176, 95-108.
- [77] J. Yang, H. M. Liu, X. Zhang, *Biotechnol. Adv.* **2014**, 32, 804-817.
- [78] E. Buddecke, *Molekulare Medizin: eine systematische Einführung*, ecomed, **2002**.
- [79] D. Luo, W. M. Saltzman, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 33-37.
- [80] M. R. Capecchi, *Cell* **1980**, 22, 479-488.
- [81] D. Lechardeur, A. S. Verkman, G. L. Lukacs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, 755-767.
- [82] D. A. Jans, C. Y. Xiao, M. H. C. Lam, *Bioessays* **2000**, 22, 532-544.
- [83] J. Vacik, B. S. Dean, W. E. Zimmer, D. A. Dean, *Gene Ther.* **1999**, 6, 1006-1014.
- [84] M. A. Zanta, P. Belguise-Valladier, J. P. Behr, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 91-96.

- [85] K. Hakamada, J. Miyake, *J. Biosci. Bioeng.* **2012**, *113*, 124-127.
- [86] F. Grosjean, P. Batard, M. Jordan, F. Wurm, *Cytotechnology* **2002**, *38*, 57-62.
- [87] V. Escriou, M. Carriere, F. Bussone, P. Wils, D. Scherman, *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 179-187.
- [88] S. Brunner, T. Sauer, S. Carotta, M. Cotten, M. Saltik, E. Wagner, *Gene Ther.* **2000**, *7*, 401-407.
- [89] I. Mortimer, P. Tam, I. MacLachlan, R. W. Graham, E. G. Saravolac, P. B. Joshi, *Gene Ther.* **1999**, *6*, 403-411.
- [90] S. Marenzi, R. P. Adams, G. Zardo, L. Lenti, A. Reale, P. Caiafa, *Mol. Biol. Rep.* **1999**, *26*, 261-267.
- [91] K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 129-138.
- [92] R. W. Carthew, E. J. Sontheimer, *Cell* **2009**, *136*, 642-655.
- [93] T. Endoh, T. Ohtsuki, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 704-709.
- [94] J. Wang, Z. Lu, M. G. Wientjes, J. L. S. Au, *Aaps J.* **2010**, *12*, 492-503.
- [95] W. J. Kim, S. W. Kim, *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 657-666.
- [96] J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Eppler, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6144-6148.
- [97] S. David, B. Pitard, J. P. Benoît, C. Passirani, *Pharm. Res.* **2010**, *62*, 100-114.
- [98] S. Nimesh, R. Chandra, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *73*, 43-49.
- [99] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904-2074.
- [100] S. Brunner, E. Furtbauer, T. Sauer, M. Kurs, E. Wagner, *Mol. Ther.* **2002**, *5*, 80-86.
- [101] T. Niidome, L. Huang, *Gene Ther.* **2002**, *9*, 1647-1652.

- [102] J. A. Wolff, V. Budker, *Adv. Genet.* **2005**, *54*, 3-20.
- [103] J. Liu, Y. Luo, Q. Liu, L. Zheng, Z. Yang, Y. Wang, J. Su, F. Quan, Y. Zhang, *Theriogenology* **2013**, *79*, 660-666.
- [104] M. A. Kay, *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 316-328.
- [105] K. A. Partridge, R. O. Oreffo, *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 295-307.
- [106] M. Carretero, M. Del Rio, M. Garcia, M. J. Escamez, I. Mirones, L. Rivas, C. Balague, J. L. Jorcano, F. Larcher, *Faseb J.* **2004**, *18*, 1931-1933.
- [107] T. Azzam, A. J. Domb, *Curr. Drug Delivery* **2004**, *1*, 165-193.
- [108] G. T. Huang, H. B. Zhang, D. Kim, L. Liu, T. Ganz, *Hum. Gene. Ther.* **2002**, *13*, 2017-2025.
- [109] A. S. Breitbart, D. A. Grande, J. M. Mason, M. Barcia, T. James, R. T. Grant, *Ann. Plast. Surg.* **1999**, *42*, 488-495.
- [110] F. L. Graham, A. J. van der Eb, *Virology* **1973**, *52*, 456-467.
- [111] S. K. Tripathy, H. B. Black, E. Goldwasser, J. M. Leiden, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 545-550.
- [112] X. B. Yan, Y. Zhang, H. B. Zhang, P. G. Wang, X. G. Chu, X. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1975-1982.
- [113] S. M. Farkhani, A. Valizadeh, H. Karami, S. Mohammadi, N. Sohrabi, F. Badrzadeh, *Peptides* **2014**, *57*, 78-94.
- [114] J. Nguyen, F. C. Szoka, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1153-1162.
- [115] T. Nakamura, H. Akita, Y. Yamada, H. Hatakeyama, H. Harashima, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1113-1121.
- [116] P. C. Issa, R. E. MacLaren, *Clin. Exp. Ophthalmol.* **2012**, *40*, 39-47.
- [117] X. Guo, L. Huang, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 971-979.
- [118] S. Prijic, G. Sersa, *Radiol. Oncol.* **2011**, *45*, 1-16.
- [119] C. Pichon, L. Billiet, P. Midoux, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 640-645.

- [120] C. T. de Ilarduya, Y. Sun, N. Duezguenes, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40*, 159-170.
- [121] D. N. Nguyen, J. J. Green, J. M. Chan, R. Langer, D. G. Anderson, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 847-867.
- [122] Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu, A. B. Yu, *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1027-1040.
- [123] B. Gupta, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 637-651.
- [124] D. Oupicky, C. Konak, K. Ulbrich, M. A. Wolfert, L. W. Seymour, *J. Control. Release* **2000**, *65*, 149-171.
- [125] M. A. Wolfert, P. R. Dash, O. Nazarova, D. Oupicky, L. W. Seymour, S. Smart, J. Strohalm, K. Ulbrich, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 993-1004.
- [126] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297-7301.
- [127] S. K. Nitta, K. Numata, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1629-1654.
- [128] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413-7417.
- [129] R. Moriguchi, K. Kogure, H. Harashima, *Int. J. Pharm.* **2008**, *363*, 192-198.
- [130] V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 145-160.
- [131] S. M. Moghimi, J. Szebeni, *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 463-478.
- [132] C. Y. Qiao, K. Zhang, H. Jin, L. Y. Miao, C. Shi, X. Liu, A. L. Yuan, J. Z. Liu, D. W. Li, C. Y. Zheng, G. R. Zhang, X. W. Li, B. Yang, H. C. Sun, *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 2985-2995.
- [133] P. F. Liu, L. B. Qin, Q. Wang, Y. Sun, M. J. Zhu, M. Shen, Y. R. Duan, *Biomaterials* **2012**, *33*, 6739-6747.

- [134] M. Thomas, A. M. Klibanov, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 14640-14645.
- [135] W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 5177-5181.
- [136] D. Fischer, T. Bieber, Y. X. Li, H. P. Elsasser, T. Kissel, *Pharm.Res.* **1999**, 16, 1273-1279.
- [137] M. Liu, B. Chen, Y. A. Xue, J. Huang, L. M. Zhang, S. W. Huang, Q. W. Li, Z. J. Zhang, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 2237-2243.
- [138] W. Liang, J. K. W. Lam, *Endosomal escape pathways for non-viral nucleic acid delivery systems*, InTech: Rijeka, Croatia, **2012**.
- [139] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *J. Control. Release* **2011**, 151, 220-228.
- [140] Y. Xu, F. C. Szoka, *Biochemistry* **1996**, 35, 5616-5623.
- [141] K. L. Douglas, C. A. Piccirillo, M. Tabrizian, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 68, 676-687.
- [142] A. Akinc, M. Thomas, A. M. Klibanov, R. Langer, *J. Gene Med.* **2005**, 7, 657-663.
- [143] J. H. Suh, D. Wirtz, J. Hanes, *Biotechnol. Prog.* **2004**, 20, 598-602.
- [144] *DIN CEN ISO/TS 80004-4:2011 Nanotechnologies - Vocabulary - Part 4: Nanostructured materials*, DIN Deutsches Institut für Normung e. V.
- [145] L. Jin, X. Zeng, M. Liu, Y. Deng, N. He, *Theranostics* **2014**, 4, 240-255.
- [146] S. M. Zakaria, S. H. Sharif, M. R. Othman, F. Yang, J. A. Jansen, *Tissue Eng. Pt B-Rev.* **2013**, 19, 431-441.
- [147] R. Y. Pelgrift, A. J. Friedman, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65, 1803-1815.
- [148] D. Arcos, M. Vallet-Regí, *Acta Mater.* **2013**, 61, 890-911.
- [149] M. V. Yigit, A. Moore, Z. Medarova, *Pharm. Res.* **2012**, 29, 1180-1188.
- [150] L. S. Wang, M. C. Chuang, J. A. A. Ho, *Int. J. Nanomed.* **2012**, 7, 4679-4695.

- [151] M. Peran, M. A. Garcia, E. Lopez-Ruiz, M. Bustamante, G. Jimenez, R. Madeddu, J. A. Marchal, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 3847-3886.
- [152] D. E. Lee, H. Koo, I. C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, I. C. Kwon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2656-2672.
- [153] B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 2434-2443.
- [154] K. Chaloupka, Y. Malam, A. M. Seifalian, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 580-588.
- [155] G. D. Moon, S. W. Choi, X. Cai, W. Y. Li, E. C. Cho, U. Jeong, L. V. Wang, Y. N. Xia, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4762-4765.
- [156] M. P. Melancon, W. Lu, M. Zhong, M. Zhou, G. Liang, A. M. Elliott, J. D. Hazle, J. N. Myers, C. Li, R. J. Stafford, *Biomaterials* **2011**, *32*, 7600-7608.
- [157] J. V. Jokerst, S. S. Gambhir, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1050-1060.
- [158] F. M. Kievit, M. Q. Zhang, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, H217-H247.
- [159] L. Maggiorella, G. Barouch, C. Devaux, A. Pottier, E. Deutsch, J. Bourhis, E. Borghi, L. Levy, *Future oncol.* **2012**, *8*, 1167-1181.
- [160] A. Gupta, S. Y. Wang, P. Pera, K. V. R. Rao, N. Patel, T. Y. Ohulchanskyy, J. Missert, J. Morgan, Y. E. Koo-Lee, R. Kopelman, R. K. Pandey, *Nanomed.-Nanotechnol.* **2012**, *8*, 941-950.
- [161] S. P. Egusquiguirre, M. Igartua, R. M. Hernandez, J. L. Pedraz, *Clin. Transl. Oncol.* **2012**, *14*, 83-93.
- [162] M. P. Melancon, A. Elliott, X. Ji, A. Shetty, Z. Yang, M. Tian, B. Taylor, R. J. Stafford, C. Li, *Invest. Radiol.* **2011**, *46*, 132-140.
- [163] W. Lu, M. P. Melancon, C. Y. Xiong, Q. Huang, A. Elliott, S. L. Song, R. Zhang, L. G. Flores, J. G. Gelovani, L. H. V. Wang, G. Ku, R. J. Stafford, C. Li, *Cancer Res.* **2011**, *71*, 6116-6121.
- [164] Z. X. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2590-2605.

- [165] H. Xu, L. Cheng, C. Wang, X. Ma, Y. Li, Z. Liu, *Biomaterials* **2011**, 32, 9364-9373.
- [166] V. Uskokovic, D. P. Uskokovic, *J. Biomed. Mater. Res.* **2011**, 96B, 152-191.
- [167] S. Santra, C. Kaittanis, J. Grimm, J. M. Perez, *Small* **2009**, 5, 1862-1868.
- [168] H. Aoki, *Science and medical applications of hydroxyapatite*, Takayama Press System Centre, JAAS, Tokyo, **1991**.
- [169] S. Bose, S. Tarafder, *Acta Biomater.* **2012**, 8, 1401-1421.
- [170] A. H. Faraji, P. Wipf, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 2950-2962.
- [171] A. Maitra, *Exp. Rev. Mol. Diagn.* **2005**, 5, 893-905.
- [172] V. Sokolova, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, H. Cölfen, H. Rehage, A. Shukla, M. Epple, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2006**, 37, 441-445.
- [173] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 1402–1416.
- [174] V. V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Epple, *Biomaterials* **2006**, 27, 3147-3153.
- [175] T. Tenkumo, O. Rotan, V. Sokolova, M. Epple, *Nano Biomed.* **2013**, 5, 64-74.
- [176] D. Kozlova, S. Chernousova, K. T., J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 396-404.
- [177] M. Chatzinikolaïdou, C. Hadjicharalambous, V. Sokolova, D. Kozlova, M. Epple, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2014**, 8, 417.
- [178] R. Gonzalez-McQuire, D. W. Green, K. A. Partridge, R. O. C. Oreffo, S. Mann, S. A. Davis, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 2236.
- [179] H. D. Dörfler, *Grenzflächen- und Kolloidchemie*, New York, **1994**.
- [180] B. V. Derjagin, *Theory of stability of colloids and thin films*, Plenum Press, New York, **1989**.
- [181] Malvern-Instruments, *Zetasizer Nano Series, user manual*, **2004**.

- [182] V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E. A. Kubareva, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 721-727.
- [183] L. Chen, J. M. McCrate, J. C. Lee, H. Li, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 105708.
- [184] A. Verma, F. Stellacci, *Small* **2010**, *6*, 12-21.
- [185] V. Mailander, K. Landfester, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2379-2400.
- [186] G. G. d'Ayala, A. Calarco, M. Malinconico, P. Laurienzo, O. Petillo, A. Torpedine, G. Peluso, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *94A*, 619-630.
- [187] A. Beyerle, M. Irmeler, J. Beckers, T. Kissel, T. Stoeger, *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 727-737.
- [188] T. Phenrat, N. Saleh, K. Sirk, H. J. Kim, R. D. Tilton, G. V. Lowry, *J. Nanopart. Res.* **2008**, *10*, 795-814.
- [189] V. Sokolova, A. Kovtun, R. Heumann, M. Epple, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 174-179.
- [190] T. Welzel, I. Radtke, W. Meyer-Zaika, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2213-2217.
- [191] A. Loyter, G. Scangos, D. Juricek, D. Keene, F. H. Ruddle, *Exp. Cell. Res.* **1982**, *139*, 223-234.
- [192] T. S. Ligon, C. Leonhardt, J. O. Radler, *PLoS One* **2014**, *9*, 11.
- [193] Z. P. Parra-Guillen, G. Gonzalez-Aseguinolaza, P. Berraondo, I. F. Troconiz, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 1487-1497.
- [194] R. Juliano, J. Bauman, H. Kang, X. Ming, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 686-695.
- [195] G. J. Jeong, H. M. Byun, J. M. Kim, H. Yoon, H. G. Choi, W. K. Kim, S. J. Kim, Y. K. Oh, *J. Control. Release* **2007**, *118*, 118-125.
- [196] S. Y. Berezhna, L. Supekova, F. Supek, P. G. Schultz, A. A. Deniz, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 7682-7687.

- [197] B. Neumann, M. Held, U. Liebel, H. Erfle, P. Rogers, R. Pepperkok, J. Ellenberg, *Nat. Methods* **2006**, 3, 385-390.
- [198] L. K. Medina-Kauwe, J. Xie, S. Hamm-Alvarez, *Gene Ther.* **2005**, 12, 1734-1751.
- [199] A. Paganin-Gioanni, E. Bellard, J. M. Escoffre, M. P. Rols, J. Teissie, M. Golzio, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 10443-10447.
- [200] F. D. Sigoillot, J. F. Huckins, F. H. Li, X. B. Zhou, S. T. C. Wong, R. W. King, *PLoS One* **2011**, 6, 14.
- [201] K. Hakamada, S. Fujita, J. Miyake, *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, 109, 62-66.
- [202] A. Paganin-Gioanni, E. Bellard, B. Couderc, J. Teissie, M. Golzio, *J. RNAi Gene Silencing* **2008**, 4, 281-288.
- [203] H. Lv, S. A. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, *J. Control. Release* **2006**, 114, 100-109.
- [204] D. Freifelder, P. F. Davison, *Biophys. J.* **1962**, 2, 235-247.
- [205] M. L. Wu, S. S. Freitas, G. A. Monteiro, D. M. Prazeres, J. A. Santos, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2009**, 53, 237-246.
- [206] W. Li, S. Liu, Y. Chen, C. Y. Zheng, N. Qi, *Proc. Biochem.* **2013**, 48, 1572-1580.
- [207] A. Margalit, S. Vlcek, Y. Gruenbaum, R. Foisner, *J. Cell. Biochem.* **2005**, 95, 454-465.
- [208] J. Hu, A. Kovtun, A. Tomaszewski, B. B. Singer, B. Seitz, M. Epple, K. Steuhl, S. Erguen, T. A. Fuchsluger, *Acta Biomater.* **2012**, 8, 1156-1163.
- [209] S. Heinemann, M. Gelinsky, H. Worch, T. Hanke, *Orthopade* **2011**, 40, 761-773.
- [210] M. Böhner, *Mater. Today* **2010**, 13, 24-30.
- [211] Y. Cai, R. Tang, *J. Mater. Chem.* **2008**, 18, 3775-3787.
- [212] M. W. Laschke, K. Witt, T. Pohlemann, M. D. Menger, *J. Biomed. Mater. Res. B* **2007**, 82, 494-505.

- [213] J. J. C. Arts, N. Verdonshot, B. W. Schreurs, P. Buma, *Biomaterials* **2006**, 27, 1110-1118.
- [214] D. Tadic, M. Epple, *Biomaterials* **2004**, 25, 987-994.
- [215] M. D. Krebs, E. Salter, E. Chen, K. A. Sutter, E. Alsberg, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, 92A, 1131-1138.
- [216] S. Neumann, A. Kovtun, I. D. Dietzel, M. Epple, R. Heumann, *Biomaterials* **2009**, 30, 6794-6802.
- [217] X. C. Yang, X. F. Walboomers, J. Van den Dolder, F. Yang, Z. Bian, M. W. Fan, J. A. Jansen, *Tissue Eng. Part A* **2008**, 14, 71-81.
- [218] D. Olton, J. Li, M. E. Wilson, T. Rogers, J. Close, L. Huang, P. N. Kumta, C. Sfeir, *Biomaterials* **2007**, 28, 1267-1279.
- [219] F.-X. Huber, N. McArthur, L. Heimann, E. Dingeldein, H. Cavey, X. Palazzi, G. Clermont, J.-P. Boutrand, *Bmc Musculoskelet. Disord.* **2009**, 10, 164.
- [220] F. X. Huber, I. Berger, N. McArthur, C. Huber, H. P. Kock, J. Hillmeier, P. J. Meeder, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, 19, 33-38.
- [221] D. Busenlechner, S. Tangl, B. Mair, G. Fugger, R. Gruber, H. Redl, G. Watzek, *Biomaterials* **2008**, 29, 3195-3200.
- [222] F. Schwarz, K. Bieling, T. Latz, E. Nuesry, J. Becker, *J. Clin. Periodontol.* **2006**, 33, 491-499.
- [223] F. X. Huber, N. McArthur, J. Hillmeier, H. J. Kock, M. Baier, M. Diwo, I. Berger, P. J. Meeder, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **2006**, 126, 533-540.
- [224] F. X. Huber, O. Belyaev, J. Hillmeier, H. J. Kock, C. Huber, P. J. Meeder, I. Berger, *Bmc Musculoskelet. Disord.* **2006**, 7, 14.
- [225] G. Decher, J. D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films* **1992**, 210–211, Part 2, 831-835.
- [226] G. Decher, *Science* **1997**, 277, 1232-1237.

- [227] G. Decher, M. Eckle, J. Schmitt, B. Struth, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1998**, 3, 32-39.
- [228] B. G. De Geest, G. B. Sukhorukov, H. Mohwald, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, 6, 613-624.
- [229] G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, M. Garstka, S. Springer, W. J. Parak, A. Munoz-Javier, O. Kreft, A. G. Skirtach, A. S. Sussha, Y. Ramaye, R. Palankar, M. Winterhalter, *Small* **2007**, 3, 944-955.
- [230] P. C. Wu, W. S. Wang, Y. T. Huang, H. S. Sheu, Y. W. Lo, T. L. Tsai, D. B. Shieh, C. S. Yeh, *Chemistry* **2007**, 13, 3878-3885.
- [231] G. B. Sukhorukov, A. A. Antipov, A. Voigt, E. Donath, H. Mohwald, *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, 22, 44-46.
- [232] V. Gribova, R. Auzely-Velty, C. Picart, *Chem. Mat.* **2012**, 24, 854-869.
- [233] T. Boudou, T. Crouzier, K. Ren, G. Blin, C. Picart, *Adv. Mater.* **2010**, 22, 441-467.
- [234] J. H. Fendler, *Chem. Mat.* **1996**, 8, 1616-1624.
- [235] A. Guenther, P. Bender, A. Tschoepe, R. Birringer, *J. Phys.-Condens. Mat.* **2011**, 23.
- [236] S. E. Lee, D. Y. Sasaki, T. D. Perroud, D. Yoo, K. D. Patel, L. P. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14066-14074.
- [237] M. P. Mattson, S. L. Chan, *Nat. Cell Biol.* **2003**, 5, 1041-1043.
- [238] J. Rüsing, *Dissertation. Calciumphosphat-Nanopartikel als Wirkstoffträger: Kolloidchemie und biomedizinische Anwendung*, Universität Duisburg-Essen, Essen, **2014**.
- [239] J. W. C. Dunlop, P. Fratzl, *Biological Composites, Vol. 40*, Annual Reviews, Palo Alto, **2010**.
- [240] M. A. Rauschmann, T. A. Wichelhaus, V. Stirnal, E. Dingeldein, L. Zichner, R. Schnettler, V. Alt, *Biomaterials* **2005**, 26, 2677-2684.

- [241] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, M. J. Glimcher, *Osteoporos. Int.* **2009**, *20*, 1013-1021.
- [242] O. P. Gautschi, S. P. Frey, R. Zellweger, *ANZ J. Surg.* **2007**, *77*, 626-631.
- [243] T. Furumatsu, Z. N. Shen, A. Kawai, K. Nishida, H. Manabe, T. Oohashi, H. Inoue, Y. Ninomiya, *J. Biochem.* **2003**, *133*, 633-639.
- [244] G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, Z. Poltorak, *Faseb J.* **1999**, *13*, 9-22.
- [245] X. Rausch-fan, Z. Qu, M. Wieland, M. Matejka, A. Schedle, *Dent. Mater.* **2008**, *24*, 102-110.
- [246] M. M. Bonab, K. Alimoghaddam, F. Talebian, S. H. Ghaffari, A. Ghavamzadeh, B. Nikbin, *BMC Cell. Biol.* **2006**, *7*, 14.
- [247] J. R. Masters, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 315-319.
- [248] M. Ahmed, R. Narain, *Biomaterials* **2013**, *34*, 4368-4376.
- [249] I. Mortimer, P. Tam, I. MacLachlan, R. W. Graham, E. G. Saravolac, P. B. Joshi, *Gene. Ther* **1999**, *6*, 403-411.
- [250] L. C. Rose, C. Kucharski, H. Uludag, *Biomaterials* **2012**, *33*, 3363-3374.
- [251] P. B. Saadeh, B. J. Mehrara, D. S. Steinbrech, J. A. Spector, J. A. Greenwald, G. S. Chim, H. Ueno, G. K. Gittes, M. T. Longaker, *Endocrinology* **2000**, *141*, 2075-2083.
- [252] J. T. Koh, Z. Zhao, Z. Wang, I. S. Lewis, P. H. Krebsbach, R. T. Franceschi, *J. Dent. Res.* **2008**, *87*, 845-849.
- [253] Z. Lin, J. S. Wang, L. Lin, J. Zhang, Y. Liu, M. Shuai, Q. Li, *Exp. Ther. Med.* **2014**, *7*, 625-629.
- [254] C. Xiao, H. Zhou, G. Liu, P. Zhang, Y. Fu, P. Gu, H. Hou, T. Tang, X. Fan, *Biomed. Mater.* **2011**, *6*.
- [255] I. Akiyama, O. Yoshino, Y. Osuga, J. Shi, M. Harada, K. Koga, Y. Hirota, T. Hirata, T. Fujii, S. Saito, S. Kozuma, *Reprod. Sci.* **2014**, *21*, 477-482.

- [256] A. Simchi, E. Tamjid, F. Pishbin, A. R. Boccaccini, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2011**, 7, 22-39.
- [257] Z. L. Shi, K. G. Neoh, E. T. Kang, W. Wang, *Biomaterials* **2006**, 27, 2440-2449.
- [258] J. G. E. Hendriks, J. R. van Horn, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, *Biomaterials* **2004**, 25, 545-556.
- [259] D. Campoccia, L. Montanaro, C. R. Arciola, *Biomaterials* **2013**, 34, 8533-8554.
- [260] P. Wu, D. W. Grainger, *Biomaterials* **2006**, 27, 2450-2467.
- [261] C. M. Xie, X. Lu, K. F. Wang, F. Z. Meng, O. Jiang, H. P. Zhang, W. Zhi, L. M. Fang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 8580-8589.
- [262] S. Chernousova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1636-1653.
- [263] P. H. Warnke, E. Voss, P. A. Russo, S. Stephens, M. Kleine, H. Terheyden, Q. Liu, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2013**, 28, 982-988.
- [264] F. Costa, I. F. Carvalho, R. C. Montelaro, P. Gomes, M. C. Martins, *Acta Biomater.* **2011**, 7, 1431-1440.
- [265] M. Kazemzadeh-Narbat, J. Kindrachuk, K. Duan, H. Jenssen, R. E. W. Hancock, R. Wang, *Biomaterials* **2010**, 31, 9519-9526.
- [266] Z. Xia, C. Zhang, Y. Zeng, T. Wang, G. Ai, *Int. Wound J.* **2014**, 11, 293-303.
- [267] D. Kraus, J. Deschner, A. Jager, M. Wenghoefer, S. Bayer, S. Jepsen, J. P. Allam, N. Novak, R. Meyer, J. Winter, *J. Cell. Physiol.* **2012**, 227, 994-1003.
- [268] J. Zhao, Z. Wang, X. Chen, J. Wang, J. Li, *Microbiol. Immunol.* **2011**, 55, 217-223.
- [269] C. Yin, H. N. Dang, H. B. Zhang, F. Gazor, D. Kim, O. E. Sorensen, G. T. Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 339, 344-354.

- [270] C. Zhang, P. Yadava, J. Sun, J. A. Hughes, *J. Drug Target.* **2006**, *14*, 646-651.
- [271] A. L. Gibson, C. L. Thomas-Virnig, J. M. Centanni, S. J. Schlosser, C. E. Johnston, K. F. Van Winkle, A. Szilagyi, L. K. He, R. Shankar, B. L. Allen-Hoffmann, *Wound Repair Regen.* **2012**, *20*, 414-424.
- [272] C. L. Thomas-Virnig, B. L. Allen-Hoffmann, *Adv. Wound Care (New Rochelle)* **2012**, *1*, 88-94.
- [273] Y. Suzuki, S. Inokuchi, K. Takazawa, K. Umezawa, T. Saito, M. Kidokoro, M. Tanaka, H. Matsuzawa, S. Inoue, I. Tuchiya, K. Ando, *Burns* **2011**, *37*, 109-116.
- [274] A. Ito, T. Takahashi, Y. Kawabe, M. Kamihira, *J. Biosci. Bioeng.* **2009**, *108*, 244-247.
- [275] A. K. Smiley, J. Gardner, J. M. Klingenberg, A. N. Neely, D. M. Supp, *J. Burn Care Res.* **2007**, *28*, 127-132.
- [276] D. Sawamura, M. Goto, A. Shibaki, M. Akiyama, J. R. McMillan, Y. Abiko, H. Shimizu, *Gene Ther.* **2005**, *12*, 857-861.
- [277] M. Thomas, Q. Ge, J. J. Lu, J. Chen, A. M. Klibanov, *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 373-380.
- [278] J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, J. M. Schroder, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5707-5713.
- [279] C. Brunot, L. Ponsonnet, C. Lagneau, P. Farge, C. Picart, B. Grosogeat, *Biomaterials* **2007**, *28*, 632-640.
- [280] A. R. Klemm, D. Young, J. B. Lloyd, *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 41-46.
- [281] M. R. Yeaman, N. Y. Yount, *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 27-55.
- [282] R. I. Lehrer, A. K. Lichtenstein, T. Ganz, *Annu. Rev. Immunol.* **1993**, *11*, 105-128.

- [283] A. K. Lichtenstein, T. Ganz, T. M. Nguyen, M. E. Selsted, R. I. Lehrer, *J. Immunol.* **1988**, *140*, 2686-2694.
- [284] A. Lichtenstein, T. Ganz, M. E. Selsted, R. I. Lehrer, *Blood* **1986**, *68*, 1407-1410.
- [285] N. K. Brogden, L. Mehalick, C. L. Fischer, P. W. Wertz, K. A. Brogden, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2012**, *25*, 167-181.
- [286] A. Baroni, G. Donnarumma, I. Paoletti, I. Longanesi-Cattani, K. Bifulco, M. A. Tufano, M. V. Carriero, *Peptides* **2009**, *30*, 267-272.
- [287] M. Nishimura, Y. Abiko, Y. Kurashige, M. Takeshima, M. Yamazaki, K. Kusano, M. Saitoh, K. Nakashima, T. Inoue, T. Kaku, *J. Dermatol. Sci.* **2004**, *36*, 87-95.
- [288] S. Liu, L. Zhou, J. Li, A. Suresh, C. Verma, Y. H. Foo, E. P. Yap, D. T. Tan, R. W. Beuerman, *Chembiochem.* **2008**, *9*, 964-973.
- [289] Y. J. Gordon, E. G. Romanowski, A. M. McDermott, *Curr. Eye Res.* **2005**, *30*, 505-515.
- [290] E. Kluver, S. Schulz-Maronde, S. Scheid, B. Meyer, W. G. Forssmann, K. Adermann, *Biochemistry* **2005**, *44*, 9804-9816.

8 Anhang

8.1 Verwendete Materialien

Verwendete Zellkulturmedien und Chemikalien

Name	Herrsteller
DMEM (<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>) GlutaMax™	Gibco® / Life Technologies™
RPMI 1640 (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)	PAA
FBS (<i>Heat inactivated fetal bovine serum</i>)	Gibco® / Life Technologies™
Geneticin	Gibco® / Invitrogen™
Penicillin/Streptomycin	Gibco® / Life Technologies™
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco® / Invitrogen™
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Molecular Probes™ / Invitrogen™
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Molecular Probes™ / Life Technologies™
DMSO (Dimethylsulfoxid)	AppliChem
CellMask™	Molecular Probes™ / Life Technologies™
PBS (<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)	Gibco® / Life Technologies™
Ampicillin, Natriumsalz	Carl Roth®
Ethanol absolut	VWR
LB-Medium	Sigma
Agar-Agar	Carl Roth®

Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Zellkulturflasche (75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche (25 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glasboden-Zellkulturschalen (3,5 mm)	MatTek, Ashland, USA
24-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt, Newton, USA
8-Well-Zellkulturplatten (8-Kammer- Aufsatz auf Glas-Objektträger, für Zellkultur behandelt)	Falcon®, NY, USA
4-Well-Zellkulturplatten (4-Kammer- Aufsatz auf Glas-Objektträger, für Zellkultur behandelt)	Falcon®, NY, USA
96-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt, Newton, USA
Rohre (15, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten (5, 10, 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
CryoPure Gefäß (1,8 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sicherheits-Bunsenbrenner	Schuett-biotec, Göttingen, Deutschland

Geräte

Name	Hersteller
Sterilbank	MSC-Advantage™ / Thermo Fisher Scientific
CO ₂ -Inkubator BB15	Thermo Fisher Scientific
Multifuge Heraeus X1R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific
UV/Vis-Spektrophotometer Cary 300 Bio	Varian
<i>Cell Density Meter</i> CO8000	WPA, Cambridge, UK
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Mechelen, Belgien
Inkubationskammer INUG2EF-KI4	TokaiHit / Keyence, Mechelen, Belgien
ELISA-Lesegerät	SLT-Labinstrument, Salzburg, Österreich
Inkubationsschüttler MaxQ4000	Thermo Fisher Scientific
Multiscan-FC	Thermo Fisher Scientific
Tischschüttler	HLC, Oehmen
Autoklav, Laboklav	SHP, Magdeburg, Deutschland
Inkubator HERAThorm	Thermo Fisher Scientific
Ultraschallgerät	Hielscher UP50H

Verwendete eukaryotische und prokaryotische Zellen

HeLa (ATCC® CCL-2™): humane Zervixepithel-Adenokarzinomzelle;

HeLa-eGFP: mit eGFP stabil transfizierte HeLa-Zelllinie;

T24 (ATCC: HTB-4): humane Karzinomzellen aus der Harnblase;

MG-63 (ATCC®: CRL-1427™): Osteoblasten-ähnliche humane Osteosarkoma-Zelllinie;

hMSCs (*human mesenchymal stem cells*) humane mesenchymale Stammzellen (Lonza);

Escherichia coli NovaBlue;

Escherichia coli DH5α.

Verwendete Kits

“Polyfect® Transfection Reagent” (Quiagen, Hilden).

“Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™ / Life Technologies™, Carlsbad, USA).

Humane BMP-7 ELISA Kit für die quantitative Bestimmung von *humane bone morphogenetic protein 7* in Lösung (Alpha Diagnostic, San Antonio, USA und Abcam, Cambridge, UK)

Humane VEGF ELISA Kit für die quantitative Bestimmung von *vascular endothelial growth factor* in Lösung (Thermo Fisher Scientific, Bonn)

Humane BD-3 ELISA Kit für die quantitative Bestimmung von *humane beta defensin 3* in Lösung (Alpha Diagnostic, San Antonio, USA).

NucleoBond® PC 10000 Endotoxin-freie Plasmid DNA-Kit Macherey-Nagel.

MSCGM™ (*mesenchymal stem cells growth medium*) BulletKit™, Lonza.

Verwendete Plasmide und siRNA

pcDNA3-eGFP (Dr. Sebastian Neumann, RUB, Bochum)

pcDNA3.1(+)-*Firefly*-Luciferase (Georges von Degenfeld und Katrin Nickel, Bayer Schering Pharma AG, Wuppertal)

BMP-7-pCMV6-XL4 (*Homo sapiens bone morphogenetic protein 7*, OriGene, Rockville, USA)

VEGF-A-pCMV6-XL5 (*Homo sapiens vascular endothelial growth factor A, transcript variant 4*, OriGene, Rockville, USA)

hBD-3-pCMV6-AC-GFP (*GFP-tagged ORF clone of Homo sapiens defensin, beta 103A (DEFB103A)*, OriGene, Rockville, USA)

EGFP-siRNA: *sense*, 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-3'; *antisense*, 5'-AUGAACUUCAGGGUCAGCUUGC-3' Mw = 14021,4 g mol⁻¹ (Invitrogen™, Paisley, UK)

8.2 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AF	AlexaFluor
AGO 2	<i>Argonaut</i>
AMP	antimikrobielles Peptid
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
CaP	Calciumphosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTMA	Dioleoyltrimethylammoniumchlorid
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
hBD	humanes beta Defensin
HBS	<i>HEPES-buffered solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen
LB	<i>lysogeny broth</i>
MCGS	<i>mesenchymal stem cell growth supplement</i>
MSCGM	<i>mesenchymal stem cell growth medium</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NP	Nanopartikel

NPC	<i>nuclear pore complex</i>
NS	Nanostäbchen
NTA	<i>nanoparticle tracking analysis</i>
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDI	Polydispersitätsindex
PEI	Polyethylenimin
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PIPES	<i>1,4-Piperazinediethanesulfonic acid</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RISC	RNA-induzierter <i>Silencing</i> Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TRITC	<i>Tetramethylrhodamine</i>
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

8.3 Publikationsliste

Reguläre Publikationen in referierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann, M. Epple, “An outer shell of positively charged poly(ethyleneimine) strongly increases the transfection efficiency of calcium phosphate/DNA nanoparticles”, *Journal of Materials Science*, 18 (2009) 4952-4957.

J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann and M. Epple, “An injectable paste of calcium phosphate nanorods, functionalized with nucleic acids, for cell transfection and gene silencing”, *Journal of Materials Chemistry*, 20 (2010) 6144-6148.

M. A. Surmeneva, R. A. Surmenev, V. F. Pichugin, S. S. Chernousova, M. Epple, “In-vitro investigation of magnetron-sputtered coatings based on silicon-substituted hydroxyapatite”, *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 5 (2011) 1202-1207.

J. Klesing, S. Chernousova, M. Epple, “Freeze-dried cationic calcium phosphate nanorods as versatile carriers of nucleic acids (DNA, siRNA)”, *Journal of Materials Chemistry*, 22 (2012) 199-204.

D. Kozlova, S. Chernousova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, “Cell targeting by antibody-functionalized calcium phosphate nanoparticles”, *Journal of Materials Chemistry*, 22 (2012) 396-404.

S. Chernousova, M. Epple, “Nanoparticles in medicine”, *Nanosystems, Nanomaterials, Nanotechnologies*, 10 (2012) 667-685.

S. Chernousova, M. Epple, “Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal”, *Angewandte Chemie International Edition*, 52 (2013) 1636-1653.

S. Chernousova, M. Epple, “Silber als antibakterielles Agens : Ion, Nanopartikel, Metall”, *Angewandte Chemie*, 125 (2013) 1678-1653.

S. Chernousova, J. Klesing, N. Soklakova, M. Epple, “A genetically active nano-calcium phosphate paste for bone substitution, encoding the formation of BMP-7 and VEGF-A”, *RSC Advances*, 3 (2013) 11155–11161.

Y.P. Sharkeev, A.Y. Eroshenko, K.S. Kulyashova, S.V. Fortuna, K.A. Suvorov, M. Epple, O. Prymak, V. Sokolova, S. Chernousova, “Microstructure, mechanical and biological properties of zirconium alloyed with niobium after severe plastic deformation”, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 44 (2013) 198-204.

K. Loza, C. Sengstock, S. Chernousova, M. Köller, M. Epple, “The predominant species of ionic silver in biological media is colloidally dispersed nanoparticulate silver chloride”, *RSC Advances*, 4 (2014) 35290-35297.

S. Chernousova, M. Epple, “Bioactive Bone Substitution Materials”, *Advanced Biomaterials and Devices in Medicine*, 1 (2014) 74-87.

S. Ristig, S. Chernousova, M. Epple, “Synthesis, characterization and cell-biological effects of alloyed 7 nm silver-gold nanoparticles”, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6 (2015) 1212–1220.

Sonstige Publikationen, Kurzbeiträge, zitierfähige Konferenzabstracts:

J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Epple, “Eine injizierbare Paste aus Calciumphosphat-Nanostäbchen zur Transfektion und zur Gen-Stummschaltung”, *Biomaterialien*, 11 (2010) 71.

S. Chernousova, M. Epple, “Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel zur Codierung antibakterieller Proteine”, *Biomaterialien*, 12 (2012) 4.

D. Kozlova, S. Chernousova und M. Epple, “Synthese von Antikörper-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln”, *Biomaterialien*, 12 (2012) 142.

A.A. Ivanova, R.A. Surmenev, M.A. Surmeneva, T. Mukhametkaliyev, K. Loza, S. Chernousova, O. Prymak, M. Epple, “Antibacterial sandwich-structured biocomposites” *Strategic Technology (IFOST)*, 9th International Forum on Strategic Technology, (2014) 472-474.

Wissenschaftliche Vorträge (V=Vortrag, P=Poster):

2nd IRUN Symposium on Nanotechnology, Kraków, Poland, 08.-09.10.2009, V. Sokolova, A. Kovtun, S. Chernousova, S. Neumann, R. Heumann, M. Epple, “Transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA-PEI nanoparticles” (V).

Nanobio Europe, Münster, 15.-17.06.2010, S. Neumann, V. Sokolova, A. Kovtun, S. Chernousova, I. D. Meyer, M. Epple, R. Heumann, “Transfection with

calcium phosphate/DNA nanoparticles – impact on intracellular calcium level and further improvements by PEI functionalization” (P).

6th International Conference on Diffusion in Solids and Liquids (DSL-2010), Paris, France, 05.-07.07.2010, M. Epple, V. Sokolova, A. Kovtun, S. Chernousova, J. Klesing, S. Neumann, R. Heumann, “Functionalized calcium phosphate nanoparticles: Tools for gene and drug delivery” (V).

Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, Beregove, Crimea, Ukraine, 06.-10.09.2010, S. Chernousova, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann, R. Heumann, M. Epple, “Application of calcium phosphate nanorods for gene transfer in vitro” (P).

IRUN Symposium on Nanotechnology, Barcelona, Spain, 14.-15.10.2010, J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, R. Heumann, M. Epple, “Nucleic-acid functionalized calcium phosphate nanorods for cell transfection and gene silencing” (V).

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. DGBM, Heiligenstadt, 18.-20.11.2010, J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Epple, “Eine injizierbare Paste aus Calciumphosphat-Nanostäbchen zur Transfektion und zur Gen-Stummschaltung” (V).

11th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine, Cambridge, UK, 19.-23.06.2011, S. Chernousova, M. Epple, “Calcium phosphate nanoparticles functionalized with DNA that encodes the formation of antimicrobial peptide for cell transfection” (V).

24th European Conference on Biomaterials, Dublin, Ireland, 04.-08.09.2011, S. Chernousova, M. Eppe, “Calcium phosphate nanoparticles that encode the formation of antibacterial proteins” (V+P).

24th European Conference on Biomaterials, Dublin, Ireland, 04.-08.09.2011, J. Klesing, S. Chernousova, S. Neumann, R. Heumann, W. Meyer-Zaika, M. Eppe, “Positively charged hydroxyapatite nanorods for cell transfection and gene silencing” (P).

Molecular Life Sciences 2011, Frankfurt am Main, S. Neumann, V. Sokolova, A. Kovtun, S. Chernousova, I.D. Dietzel, M. Eppe, R. Heumann, “Cellular transfection with calcium phosphate/DNA nanoparticles – low intracellular calcium disturbance and further developments by PEI-functionalization” (P).

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Gießen, 10.-12.11.2011 S. Chernousova, M. Eppe, “Calciumphosphat/DNA-Nanopartikel mit antibakteriellen Eigenschaften” (V).

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Gießen, 10.-12.11.2011, D. Kozlova, S. Chernousova, M. Eppe, “Synthese von Antikörper-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln” (P).

9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China, 01.-05.06.2012, D. Kozlova, S. Chernousova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Eppe, “Conjugation of antibodies to calcium phosphate nanoparticles for selective cell targeting” (V).

9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China, 01.-05.06.2012, J. Klesing, S. Chernousova, M. Epple, “Multishell calcium phosphate polymer/DNA nanoparticles as transfection agents for BMP-7 and VEGF” (P).

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg, 01.-03.11.2012, N. Soklakova, S. Chernousova, J. Klesing, M. Epple, “Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit BMP-7 und VEGF-kodierender Plasmid-DNA, zur Transfektion von Zellen” (P).

4th German-Ukrainian Symposium, Ilmenau, 18.-20.09.2012, D. Kozlova, S. Chernousova, M. Epple, “Antibody-conjugated calcium phosphate nanoparticles for biomolecular cellular delivery” (V).

4th German-Ukrainian Symposium, Ilmenau, 18.-20.09.2012, N. Soklakova, S. Chernousova, J. Klesing, D. Kozlova, M. Epple, “Genetically active nanocalcium phosphate pastes for bone regeneration” (P).

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Dresden, 06.-08.11.2014, S. Chernousova, M. Epple, “*In-situ*-Untersuchung der Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln durch *time-lapse microscopy*” (P).

2014 MRS Fall Meeting, Boston, USA, 30.11.-05.12.2014, K. Loza, C. Sengstock, S. Chernousova, M. Köller, M. Epple, “The predominant species of ionic silver in biological media is colloiddally dispersed nanoparticulate silver chloride” (V).

Patent

M. Epple, J. Klesing, S. Chernousova, D. Zukowski, Deutsche Patentanmeldung DE 10 2011 110 128, "Hydroxylapatithaltige Substanz sowie Verfahren zu deren Herstellung" (angemeldet 15.08.2011).

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen in der digitalen Version nicht einzusehen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Calciumphosphat-Nanopartikel für die Transfektion zur Synthese
biologisch aktiver Proteine und zur Gen-Stummschaltung“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen
benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner
anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Mai 2015

Svitlana Chernousova

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Matthias Epple für die Einladung in der Arbeitskreis, für die Möglichkeit an zahlreichen Konferenzen und Auslandsaufenthalten teilzunehmen, für die Unterstützung und besonders für das Verständnis in allen Situationen bedanken.

Frau Prof. Dr. Bettina Siebers danke ich für die Begutachtung der Dissertation als Zweitgutachterin.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralf Heumann, Herrn Dr. Sebastian Neumann, Herrn Dr. Jan Klesing und Herrn Dr. Johannes Rüsing für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Frau Dr. Viktoriya Sokolova danke ich für die Zusammenarbeit und für viele hilfreiche Diskussionen.

Ich danke Frau Dr. Diana Kozlova für die schöne Zusammenarbeit und für die freundliche Unterstützung.

Danke an Frau Kateryna Loza für die exzellente REM- und wissenschaftliche Expertise und für die freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. Oleg Prymak und Frau Olga Rotan danke ich für die interessanten Diskussionen.

Frau Sabrina Berger, Frau Alwina Lübke und Herrn Dr. Joachim Enax danke ich für die Korrektur dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Frau Carola Fischer, Frau Sabine Bollman und Frau Sabine Kiefer für die beste und herzliche Hilfe bei allen technischen und organisatorischen Problemen.

Frau Ursula Giebel danke ich für die KPT-Einweisung und für die Hilfe.

Herrn Smail Boukercha danke ich für die schönen professionellen REM-Aufnahmen und für die REM-Einweisung.

Für die elementaranalytische Charakterisierung den Proben danke ich Frau Veronika Hiltenkamp und Frau Kerstin Brauner.

Ich danke allen ehemaligen und heutigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises für die schöne Zusammenarbeit.

Besonders danke ich Frau Dr. Anna Kovtun und Frau Dr. Olga Shatneva für die Motivation und für die freundliche Unterstützung.

Ich danke meinen Eltern, meinem Mann und meinem Sohn für die Liebe, die Unterstützung und für die unendliche Geduld.